



**ISTOM**

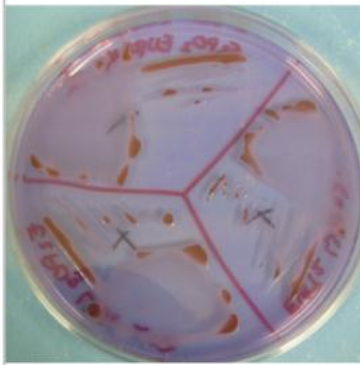
**École supérieure d'Agro-Développement International**

32, Boulevard du Port - 95094 - Cergy-Pontoise Cedex

tél : 01.30.75.62.60 télécopie : 01.30.75.62.61 [istom@istom.net](mailto:istom@istom.net)

## **MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

### **ÉTUDE DE LA FAISABILITE D'UNE METHODE DE LUTTE INNOVANTE ET AGROECOLOGIQUE CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN : CAS DE LA GUYANE**



*(Launay, 2012)*

**Soutenu à l'ISTOM en octobre 2012**



**LAUNAY Julie**

Promotion 98

Stage effectué en Guyane et Martinique

Du 3 mars 2012 au 3 septembre 2012

Au sein de CIRAD Guyane

Maîtres de stage : GUYOT Jean, DEBERDT Péninna

Tutrice de mémoire : NEEMA Claire



**ISTOM**

**École supérieure d'Agro-Développement International**

32, Boulevard du Port - 95094 - Cergy-Pontoise Cedex

tél : 01.30.75.62.60 télécopie : 01.30.75.62.61 [istom@istom.net](mailto:istom@istom.net)

## **MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

### **ÉTUDE DE LA FAISABILITE D'UNE METHODE DE LUTTE INNOVANTE ET AGROECOLOGIQUE CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN : CAS DE LA GUYANE**

**Soutenu à l'ISTOM en octobre 2012**



**LAUNAY Julie**

Promotion 98

Stage effectué en Guyane et Martinique

Du 3 mars 2012 au 3 septembre 2012

Au sein de CIRAD Guyane

Maîtres de stage : GUYOT Jean, DEBERDT Péninna

Tutrice de mémoire : NEEMA Claire

## RESUME

---

*Ralstonia solanacearum* est l'agent causal du flétrissement bactérien, maladie qui touche plus de 200 espèces végétales. Une population plus agressive que les autres, population émergente, a été découverte en Martinique en 1998. Sa présence en Guyane limite la production des Solanacées. Cette étude complète les connaissances sur les souches guyanaises de cette bactérie par des prélèvements et l'étude de leur pouvoir pathogène. La population émergente guyanaise s'avère être très agressive et virulente. L'expérimentation d'une méthode de lutte par l'introduction de trois plantes de service en interculture a été testée. Ces plantes n'ont pas montré un pouvoir assainissant par rapport aux témoins. De plus, la mise en place de l'interculture est très coûteuse pour le producteur. Il est donc nécessaire d'optimiser la méthode de lutte.

**Mots clés :** diversité génétique, expérimentation, flétrissement bactérien, isolement bactérien, méthode de lutte, phylotypage, plantes de service, *Ralstonia solanacearum*, Solanacées.

## Summary

*Ralstonia solanacearum* is the main cause of the bacterial wilt, a disease touching more than 200 plant species. A new emerging population, more aggressive than the others, was discovered in Martinique in 1998. Its presence in French Guyana limits the produce of Solanaceous. By sampling and studying their pathogenicity this study supplements knowledge of strains from French Guyana. Emerging Guyanese population proves to be very aggressive and virulent. Experimenting a fighting method by introducing three service plants on intercropping was tested. these plants didn't show sanitizing power comparing to controls. In addition, the introduction of this intercropping is very costly for the producer. It is therefore necessary to optimize the control method.

**Keywords:** bacterial isolation, bacterial wilt, control method, experimentation, genetic diversity, phylotypage, *Ralstonia solanacearum*, service plants, Solanaceous.

## Resumen

*Ralstonia solanacearum* es el agente causal de la enfermedad de la marchitamiento bacteriana que afecta a más de 200 especies de plantas. Una población más agresiva que otros, población emergente fue descubierto en Martinica en 1998. Su presencia en Guyana limita la producción de las solanáceas. Este conocimiento exhaustivo de las cepas de esta bacteria guyaneses por muestreo y estudio de su patogenicidad. Emergentes población guyanesa ha demostrado ser muy agresivo y virulento. El ensayo de un método de control por la introducción de tres plantas en servicio intercultural fue probado. Estas plantas no mostró poder desinfectante comparación con los controles. Además, la introducción de intercalado es muy costoso para el productor. Por tanto, es necesario optimizar el método de control.

**Palabras clave:** diversidad genética, la experimentación, la marchitez bacteriana, el aislamiento bacteriano, el método de control, phylotypage, plantas de servicio, *Ralstonia solanacearum*, Solanaceae.

## **TABLES DES MATIERES**

---

Résumé .....	3
Tables des matières.....	4
Tables des illustrations.....	6
Listes des abréviations et des sigles .....	7
Remerciements .....	9
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>10</b>
<b>I. L'AGRICULTURE EN GUYANE : LE CONTEXTE GÉNÉRAL ET LA PROBLÉMATIQUE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN.....</b>	<b>12</b>
1.1. L'AGRICULTURE EN GUYANE : HISTORIQUE ET CONTEXTE .....	12
1.1.1. Généralités .....	12
1.1.2. La filière fruits et légumes en Guyane .....	13
1.1.3. Le contexte pédoclimatique guyanais.....	14
1.1.4. Les problèmes majeurs auxquels sont confrontés les producteurs.....	14
1.2. LE FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN, PROBLEME MAJEUR DES CULTURES.....	14
1.2.1. L'agent causal du flétrissement bactérien : <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	15
1.2.2. L'épidémiologie du flétrissement bactérien .....	16
1.2.3. Une nouvelle souche émergente qui inquiète.....	19
1.2.4. Le flétrissement bactérien en Guyane .....	19
1.2.5. Les méthodes de lutte contre le flétrissement bactérien .....	20
1.3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	23
<b>2. ÉTUDE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN EN GUYANE ET PROPOSITION D'UNE MÉTHODE DE LUTTE INNOVANTE.....</b>	<b>26</b>
2.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	26
2.1.1. Le matériel biologique .....	26
2.1.2. Isolement des souches de <i>R. solanacearum</i> .....	29
2.1.3. Typage moléculaire des souches de <i>R. solanacearum</i> .....	29
2.1.4. Dispositif expérimental pour l'évaluation du pouvoir pathogène .....	30
2.1.5. Dispositif expérimental de la méthode de lutte agroécologique.....	32
2.1.6. Les calculs et analyses des données.....	34
2.2. RÉSULTATS .....	35
2.2.1. Étude de la diversité génétique de <i>R. solanacearum</i> issue de la collection de souches guyanaises .	35
2.2.2. Évaluation du pouvoir pathogène de 7 souches de <i>Ralstonia solanacearum</i> représentatives de la collection guyanaise .....	37
2.2.3. L'intégration des plantes de service en interculture afin de limiter les dégâts causés par le flétrissement bactérien en Guyane .....	43
<b>3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>47</b>
3.1. LA DIVERSITÉ DES POPULATIONS DE <i>R. SOLANACEARUM</i> EN GUYANE .....	47
3.1.1. Une nouvelle cartographie des souches de <i>R. solanacearum</i> .....	47

3.1.2.	La présence de <i>R. solanacearum</i> confirmée sur un précédent forêt .....	48
3.1.3.	Découverte d'une nouvelle souche de <i>R. solanacearum</i> en Guyane ? .....	49
3.1.4.	Le phylotype II/4NPB : une souche qui inquiète .....	49
3.1.5.	La population émergente menace aussi les Cucurbitacées .....	49
<b>3.2.</b>	<b>INTRODUCTION DE PLANTES DE SERVICE EN INTERCULTURE ET IMPACT SUR LE FLETRISSEMENT</b>	
<b>BACTERIEN</b>	.....	<b>51</b>
3.2.1.	Le choix des 3 plantes de services.....	51
3.2.2.	Les résultats obtenus en Guyane .....	51
3.2.3.	L'introduction de <i>C. spectabilis</i> en interculture .....	51
3.2.4.	L'introduction du mélange d'espèces <i>C. spectabilis</i> / <i>C. juncea</i> en interculture .....	52
3.2.5.	Une efficacité mitigée des Crotalaires .....	52
3.2.6.	Introduction des cives en interculture : des résultats peu concluant.....	53
3.2.7.	Comment expliquer ces résultats ?.....	53
<b>3.3.</b>	<b>FAISABILITE D'IMPLANTER DES PLANTES DE SERVICES EN INTERCULTURE POUR LUTTER CONTRE LE</b>	
<b>FLETRISSEMENT BACTERIEN EN GUYANE</b>	.....	<b>54</b>
3.3.1.	Des coûts importants de mise en place de l'interculture .....	54
3.3.2.	Une interculture de cives très coûteuse .....	55
3.3.3.	Trois modalités intéressantes financièrement.....	55
3.3.4.	Le système traditionnel coûteux.....	56
3.3.5.	Des résultats à nuancer.....	56
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>58</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>59</b>
	<b>Table des annexes .....</b>	<b>62</b>

## TABLES DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : répartition du nombre d'exploitants guyanais en fonction de leur SAU (source Agreste, 2011) .....	12
<b>Figure 2</b> : arbre phylogénétique à partir de données partielles de séquences de gènes endoglucanase .....	16
<b>Figure 3</b> : carte des zones de prélèvements de souches Rs réalisés en 2011. et zones de prélèvement prévues en 2012. ....	26
<b>Figure 4</b> : les différentes PCR utilisées pour caractériser les différents phylotypes et séquévars selon Fegan et Prior (2005). ....	30
<b>Figure 5</b> : plan de la répartition des combinaisons souche*cultivar en chambre climatique. ....	31
<b>Figure 6</b> : dispositif expérimental avec 5 traitements et 5 répétitions. ....	33
<b>Figure 7</b> : répartition des 66 souches de <i>R. solanacearum</i> prélevées en Guyane et typées au CIRAD-PRAM. ....	36
<b>Figure 8</b> : répartition des différents phylotypes suivant les exploitations où le sol n'a jamais été cultivé. ....	36
<b>Figure 9</b> : IFB moyen en fonction des souches inoculées sur les cultivars de tomates. ....	38
<b>Figure 10</b> : courbes de l'IFB pour les souches émergentes et pour les souches historiques après 28 JAI. ....	38
<b>Figure 11</b> : AUDPC moyen en fonction des souches inoculées sur les cultivars de tomates à 28 JAI. ....	39
<b>Figure 12</b> : évolution l'AUDPC moyen des souches émergentes et des souches historiques sur les cultivars de tomates. ....	39
<b>Figure 13</b> : évolution de l'IFB moyen et de l'AUDPC moyen chez les cultivars de tomates L390 et HW7996. ....	40
<b>Figure 14</b> : IFB chez les cultivars HW7996 et L390 en fonction des souches de <i>R. solanacearum</i> inoculées. ....	41
<b>Figure 15</b> : classification des combinaisons "variété*souche" en fonction de l'incidence. ....	41
<b>Figure 16</b> : évolution de l'IFB au cours du temps pour les souches inoculées sur le cultivar de concombre EUREKA. ....	42
<b>Figure 17</b> : suivi de l'AUDPC moyen jusqu'à 42 JAI pour le cultivar de concombre EUREKA. ....	42
<b>Figure 18</b> : évolution de l'IFB sur la modalité "témoin sensible" lors de la phase de l'expérimentation. ....	43
<b>Figure 19</b> : matière fraîche (MF) et matière sèche (MS) produites par les trois plantes de service durant la phase d'interculture (en t/ha). ....	44
<b>Figure 20</b> : indice de flétrissement bactérien (IFB) à 69 jours après transplantation. ....	44
<b>Figure 21</b> : hauteur moyenne des plants d'aubergine à l'issue de la phase 3. ....	45
<b>Figure 22</b> : production des 5 modalités 69 jours après transplantation (en kg). ....	46
<b>Figure 23</b> : répartition géographique des populations de <i>R. solanacearum</i> en Guyane sur carte pédologique (source : ORSTOM). ....	47
 <b>Photographie 1</b> : observations des symptômes sur tomates en chambre climatique (J. Launay, 2012). ....	17
<b>Photographie 2</b> : <i>Allium fistulosum</i> (Launay, 2012). ....	23
<b>Photographie 3</b> : plantations de tomates pièges chez les producteurs (J. Launay, 2012). ....	27
<b>Photographie 4</b> : illustration de la notation des plants selon l'échelle de Coupat-Goutaland et al., 2011 (J. Launay, 2012). ....	32
 <b>Tableau 1</b> : typologie à dire d'experts des principaux systèmes de production présents en Guyane (Galan, 2010). ....	13
<b>Tableau 2</b> : liste des prélèvements de <i>R. solanacearum</i> réalisés en Guyane de 1983 à nos jours (source : DAAF, SPV) ....	20
<b>Tableau 3</b> : détails des 5 exploitations choisies pour avoir un précédent forêt ....	27
<b>Tableau 4</b> : Liste des souches testées pour l'évaluation du pouvoir pathogène. ....	28
<b>Tableau 5</b> : comparaison des taux de flétrissement bactérien à 37 jours en Guyane et en Martinique. ....	52
<b>Tableau 6</b> : coûts de mise en place suivant les différentes modalités mises en interculture à l'échelle de la parcelle expérimentale. ....	55

## LISTES DES ABREVIATIONS ET DES SIGLES

---

ADN : acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analysis of variance (analyse de la variance)

ARMEFLHOR : Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Économie Fruitière Légumière et HORTicole

AsinIFB : arc sinus de l'indice de flétrissement bactérien

AUDCP : area under the disease progression curve (aire sous la courbe de la progression de la maladie)

cf : se conférer à

CFU : colony forming unit (unité formant une colonie)

CIRAD : centre international de la recherche agronomique pour le développement

cm : centimètre ( $1\text{cm} = 10^{-2}\text{ m}$ )

CPG : Casamino Peptone Glucose (milieu de culture non sélectif)

*C. spectabilis*, *C. juncea* : *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria juncea*

DAAF : direction de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt

€ : euro

EPLEFPA : Établissement Public Local d'Enseignement et de Formation professionnelle Agricole

etc : et cætera

FREDON : Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles

h : heure

ha : hectare ( $1\text{ ha} = 10\,000\text{ m}^2$ )

HW7996 : Hawaii 7996

hrp : hypersensitive reaction and pathogenicity

ICB : indice de colonisation bactérienne

IFB : indice de flétrissement bactérien

JAI : Jour Après Inoculation

kg : kilogramme ( $1\text{kg} = 1\,000\text{ g}$ )

MF : matière Fraiche

mL : millilitre ( $1\text{mL} = 10^{-3}\text{ L}$ )

mm : millimètre ( $1\text{ mm} = 10^{-3}\text{ m}$ )

MS : matière sèche

m<sup>2</sup> : mètre carré

n° : numéro

NPB : no pathogenic of banana

PCR : polymerase chain reaction

pmx-PCR : Phylotype-specific multiplex- polymerase chain reaction

PRAM : Pôle de Recherche Agro-environnemental de la Martinique

*P. fluorens* : *Pseudomonas fluorens*

REP : répétition

*R. solanacearum* : *Ralstonia solanacearum*

QTL : Quantitative Trait Loci

SAU : surface agricole utile

SALIM : Service de l'alimentation

SMSA : milieu sélectif modifié

SPV : Service de la Protection des Végétaux

sq : séquévar

T : température

t : tonne

UE : unité expérimentale

UR : Unité de Recherche

UMR PVBMT : unité mixte de recherche sur les peuplements végétaux et bioagresseurs en milieu tropical

UPR HORTYS : unité de recherche du CIRAD sur le fonctionnement agroécologique et performances des systèmes de culture horticoles

VBNC : viable but no cultivable

°C : degré Celsius

μL : microlitre ( $1\mu\text{L} = 10^{-6} \text{ L}$ )

+/- : plus ou moins

% : pourcentage



## REMERCIEMENTS

---

Je remercie toutes les personnes qui ont participé, de loin ou de près à la réussite de mon stage, je pense particulièrement :

À mon maître de stage Jean Guyot qui m'a suivie tout au long de mon stage, à l'écoute il a su m'orienter pour faire les bons choix.

À Péninna Deberdt qui m'a accueillie durant 2 mois au PRAM, qui a partagé avec moi son savoir sur le flétrissement bactérien, qui s'est beaucoup impliquée dans mon encadrement pour la rédaction du mémoire et l'a enrichi par son analyse critique,

A Emmanuel Wicker, chercheur de l'UMR PVBMT pour ses échanges et ses informations qui m'ont permis d'alimenter ma discussion,

Merci à Pierre Bouteiller et à Frédéric Biro pour leurs conseils techniques, leur investissement pour la mise en place de l'expérimentation qui ne fut pas de tout repos et qui ont su répondre à mes questions techniques,

Merci aux agents du SALIM : Laura Demade pour son suivi, son soutien et son aide lors des isolements au laboratoire ; Luc Lebreton, et Damien Laplace pour leur suivi et leurs conseils,

Merci à l'équipe de phytopathologie du PRAM, et particulièrement à Régine Coranson-Beaudu pour l'appui technique au sein du laboratoire et la transmission de son savoir-faire et Pricillia pour l'aide qu'elle m'a apportée.

Merci à Francis Vigné qui m'a formée sur son temps libre à l'isolement de la bactérie.

Merci aux techniciens agricoles, je pense particulièrement à Patrick Erre, qui m'a orientée vers des producteurs de Solanacées.

Merci au membre du projet Clara d'avoir collaboré avec nous pour trouver des parcelles récemment déforestées,

Merci aux agriculteurs du temps qu'ils nous ont accordé et de nous avoir permis d'utiliser leur parcelle,

Merci à Claire Neema, ma tutrice, qui a suivi l'avancement de mon travail tout au long de ces 6 mois et qui m'a conseillée pour la rédaction de ce mémoire.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

La Guyane est le département français où la croissance démographique est la plus forte ; afin de nourrir cette population grandissante, le secteur agricole est en forte croissance ces dernières années. Les productions vivrières occupent une place importante dans ce secteur tandis que la production de Solanacées, bien que marginale, tend à se développer.

La culture des solanacées (tomate, aubergine, piment, poivron) est rendue difficile du fait de maladies phytosanitaires responsables de pertes considérables. Le problème phytosanitaire majeur est le flétrissement bactérien causé par la bactérie *Ralstonia solanacearum*.

Mon sujet de stage s'insère dans cette problématique.

L'agent *Ralstonia solanacearum*, se classe parmi les pathogènes le plus dévastateur des cultures de Solanacées. Cette bactérie pénètre par le système racinaire de la plante et prolifère dans les vaisseaux du xylème. Le flétrissement irréversible se développe rapidement et entraîne la mort de la plante. Cette maladie tellurique touche un large spectre d'hôtes et affecte aussi bien les monocotylédones que les dicotylédones (Kelman, 1998 ; Lebeau et al, 2011). Elle s'est propagée dans le monde entier en raison de la capacité de *R. solanacearum* à s'adapter aussi bien dans les régions tropicales et subtropicales que tempérées (Hayward, 1994 ; Elphinstone, 2005). Le mode de vie de cette bactérie lui permet de se maintenir, de se diffuser rapidement ou de s'adapter à différentes niches écologiques telles que le sol, l'eau et les végétaux. Les facultés exceptionnelles d'adaptation de cet agent pathogène, sa forte diversité génétique et phénotypique augmentent considérablement les difficultés à trouver des méthodes de contrôle et de lutte durables. L'agent *R. solanacearum* est composé de quatre groupes de souches monophylétiques, nommés phylotypes, et qui correspondent à l'origine géographique des souches: le phylotype I comprend les souches originaires primitivement d'Asie, le phylotype II d'Amérique, phylotype III d'Afrique et le phylotype IV d'Indonésie (Fegan et Prior, 2005).

Les souches de phylotypes I et II sont connues pour causer le flétrissement bactérien sur les cultures de Solanacées en Guyane depuis les années 1960 (Digat, 1967).

Récemment en Guyane, la caractérisation génétique des souches de *R. solanacearum* d'une collection établie en 2011 (Noreskal, 2011), collectées sur Solanacées, a permis de mettre en évidence la coexistence des deux populations de *R. solanacearum*: (i) une population « historique » identique à celle connue depuis les années 1960, inféodées aux Solanacées et (ii) une population « émergente », génétiquement proche de la population identifiée en Martinique en 1998. Cette dernière a élargi son spectre d'hôtes aux Cucurbitacées et est plus agressive sur tomate que la population historique.

Dans ce contexte phytosanitaire alarmant, il est urgent de développer une stratégie de lutte intégrée durable et respectueuse de l'environnement pour lutter contre le flétrissement bactérien.

Pour répondre à ce problème, il apparaît nécessaire de compléter les connaissances sur le flétrissement bactérien en Guyane ; cela passe par l'approfondissement des acquis sur la diversité génétique de l'agent *R. solanacearum* en Guyane, mais aussi par l'acquisition de connaissances sur le pouvoir pathogène des souches locales guyanaises.

L'acquisition de nouvelles connaissances sur les souches de *R. solanacearum* est indispensable afin mettre au point une méthode de gestion agroécologique de la maladie.

Dans le cadre d'un programme de lutte intégrée contre le flétrissement des solanacées maraîchères en Martinique, des plantes de services, introduites en interculture avant une culture de tomate, sont actuellement à l'étude au CIRAD-PRAM (Fernandes *et al.*, 2012 ; Mathurin, 2012). Mon stage permet d'expérimenter, dans le contexte guyanais, les produits de la recherche du CIRAD-PRAM, obtenus dans le cadre de ce programme.

La première partie de mon mémoire est consacrée à une recherche bibliographique présentant le contexte agricole guyanais, la place des Solanacées dans ce secteur ainsi que l'agent pathogène *R. solanacearum*.

La deuxième partie est consacrée aux prospections et aux expérimentations réalisées dans le cadre de mon stage, pour acquérir des connaissances sur les souches de *R. solanacearum* d'origine guyanaise ainsi que pour évaluer une méthode de lutte agroécologique contre le flétrissement bactérien via l'introduction de plantes de service.

Enfin, la troisième partie est consacrée à la discussion, la compréhension des résultats obtenus, la mise en avant des limites de mon étude et des perspectives à envisager.

## I. L'AGRICULTURE EN GUYANE : LE CONTEXTE GÉNÉRAL ET LA PROBLÉMATIQUE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN

L'agriculture en Guyane reste encore vivrière, peu mécanisée et peu productive. La culture des solanacées y est marginale du fait d'un manque de technicité de la part des producteurs et à cause de nombreuses maladies qui limitent son développement.

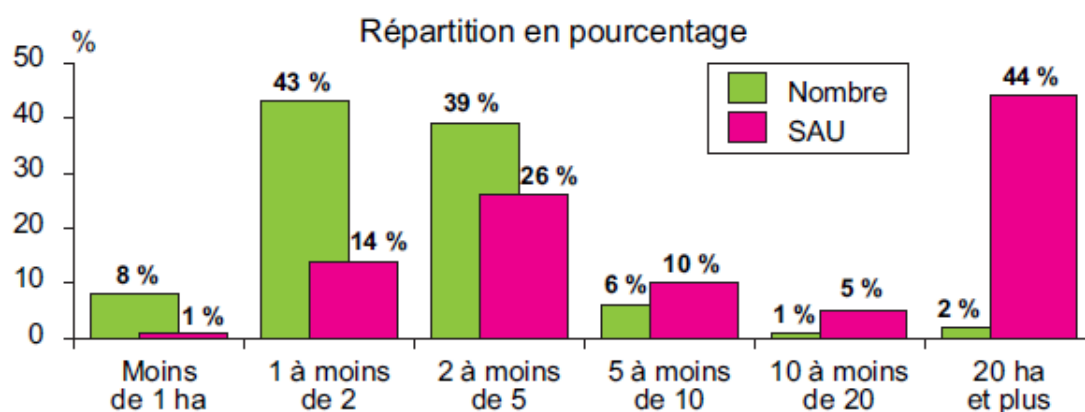
Le flétrissement bactérien, causé par l'agent pathogène *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*), est le principal frein à la culture de solanacées en Guyane.

### 1.1. L'AGRICULTURE EN GUYANE : HISTORIQUE ET CONTEXTE

#### 1.1.1. Généralités

Le secteur agricole guyanais se dynamise et prend une place de plus en plus importante ces dernières décennies. Entre les deux recensements agricoles de 2000 et 2010, le nombre d'exploitations est passé de 5318 à 5983, soit une augmentation de 13 %. La Guyane est le seul département français qui voit son nombre d'exploitations agricoles augmenter. La région du Maroni est celle où la croissance est la plus forte ; elle concentre 50 % des exploitations agricoles. Cette augmentation est le reflet de la croissance démographique de l'Ouest guyanais.

La SAU (surface agricole utile) est de 25 133 hectares (ha) pour une surface d'un peu plus de 8 millions d'hectares, ce qui représente environ 3 % de la Guyane. La répartition de la SAU est très inégale comme le montrent la figure 1 et le tableau 1. Un faible nombre d'exploitants se partage de grandes surfaces alors que 90 % des exploitants possèdent moins de 5 ha (Agreste, 2011).



**Figure 1** : répartition du nombre d'exploitants guyanais en fonction de leur SAU (source Agreste, 2011)

Une typologie des principaux systèmes de production et leur localisation ont été réalisées par des experts suite à des enquêtes (tableau 1).

Principaux systèmes de production	Estimation du nombre d'exploitations concernées	Bande côtière	Nord-ouest	Haut Maroni	Est et Bas Oyapock	Haut Oyapock
Abattis « traditionnel » avec ou non objectif de vente	4800	x	x	x	x	x
Abattis avec temps de jachère longue écourté avec ou non objectif de vente		x	x	x	x	x
Abattis avec temps de jachère longue écourté avec ou non objectif de vente + parcelle avec maraîchage/arboriculture/élevage		x	x			
Les exploitations maraîchères de plein champ avec peu de surface	200		x		x	
Les exploitations de maraîchage de plein champ avec parcelles spécialisées (ananas, dachine) et/ou verger			x		x	
Maraîchage de plein champ et cultures sous abri avec parcelles spécialisées			x		x	
Spécialisé en arboriculture			x		x	
Spécialisé en ananas					x	
Les grands domaines bovins	10	x	x			
Les élevages de ruminants avec réserve foncière	30	x	x			
Les élevages de monogastriques (volaille et/ou porcs)	20	x	x			
Les grands domaines diversifiés : poly-élevage	5	x	x			
Les pluri-actifs avec élevage de petits ruminants	10					

**Tableau 1** : typologie à dire d'experts des principaux systèmes de production présents en Guyane (Galan, 2010).

Cette typologie met en avant le grand nombre d'exploitations pratiquant l'abattis. L'élevage, le maraîchage et l'arboriculture concernent encore peu d'exploitations.

### 1.1.2. La filière fruits et légumes en Guyane

#### 1.1.2.1. Historique

La filière fruits et légumes de Guyane a été mise en place par les Hmongs, réfugiés du Laos dans les années 1970. Ces cultures vivrières, principalement maraîchères à l'origine, deviennent de plus en plus des cultures marchandes.

Malgré les sols pauvres de la région, le climat permet de produire une large gamme de produits et d'avoir plusieurs assolements par année pour certaines cultures. Cette filière repose sur une main-d'œuvre importante, principalement familiale. Elle reste peu mécanisée et la commercialisation de la production via les coopératives est très peu organisée.

Le maraîchage prend une petite place dans le paysage agricole guyanais : seulement 3 % de la SAU soit 697 ha. La production de fruits et légumes est estimée entre 15 000 et 20 000 tonnes par an, dont 80 % sont écoulées en vente directe.

#### 1.1.2.2. La culture de solanacées en Guyane

La culture de solanacées représente environ 1 % de la production agricole guyanaise.

Parmi les solanacées, ce sont les aubergines, tomates et poivrons-piments qui nous intéressent dans le cadre de notre étude.

Les surfaces développées (surface\*nombre de cycle par année) pour ces cultures sont :

- 87 ha en aubergines soit 12 % de la SAU utilisée pour le maraîchage ;

- 126 ha en tomates soit 18 % de la SAU utilisée pour le maraîchage ;
- 20 ha de piments/poivrons soit 3 % de la SAU utilisée pour le maraîchage (Agreste, 2011).

### 1.1.3. Le contexte pédoclimatique guyanais

La majorité des sols guyanais est de nature ferrallitique ou podzolique avec une forte teneur en sable. Ces sols sont, en général, peu fertiles et ont un pH acide compris entre 4 et 5, avec une faible capacité d'échange cationique. Afin de permettre l'agriculture sur ces sols, l'apport d'amendement de matières organiques et d'oligo-éléments est indispensable.

Le climat est de type équatorial humide. L'humidité relative varie en fonction des saisons, elle est comprise entre 80 et 90%. La température varie peu, elle est en moyenne de 27°C. Les précipitations sont importantes et fluctuent en fonction des saisons qu'elles rythment en 4 périodes :

- de mi-novembre à mi-février : petite saison des pluies ;
- de mi-février à mars : petit été de mars ;
- de avril à mi-août : grande saison des pluies ;
- de mi-août à mi-novembre : grande saison sèche.

La pluviométrie est d'environ 3 000 mm par an.

### 1.1.4. Les problèmes majeurs auxquels sont confrontés les producteurs

En Guyane, la culture des solanacées en plein champ est devenue rare. Face aux nombreuses maladies et aux ravageurs, dus à la forte humidité des sols, les producteurs ont opté pour une production hors-sol ou en pots.

Cependant, une minorité de producteurs ont les moyens d'investir dans ce genre de production. Il est donc nécessaire de trouver des solutions alternatives pour permettre une production de tomates, aubergines et poivron-piments, en plein champ.

La nature des sols guyanais, l'humidité relative forte et l'importante pluviométrie sont des facteurs propices au développement des maladies et en particulier du flétrissement bactérien (Prior *et al.*, 1998).

## 1.2. LE FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN, PROBLEME MAJEUR DES CULTURES

*Ralstonia solanacearum* est une bactérie tellurique aérobie stricte qui appartient au groupe des bêta-protéobactéries. Elle est responsable du flétrissement d'une cinquantaine de familles botaniques à travers le monde, ce qui représente plus de 200 espèces végétales. Parmi les espèces touchées, certaines présentent un intérêt économique fort pour les agro-industries telles que la pomme de terre, la tomate, l'aubergine, le poivron, le tabac, le bananier, etc. (Kelman, 1998).

Bien que la bactérie soit présente principalement dans les zones tropicales et subtropicales, on assiste à la dissémination récente de souches dans les zones tempérées (Europe, Etats-Unis) (Wicker *et al.*, 2009).

### 1.2.1. L'agent causal du flétrissement bactérien : *Ralstonia solanacearum*

L'agent *R. solanacearum* présente une grande variabilité aussi bien génomique, phénotypique que pathogénique. Cette bactérie est un organisme modèle reconnu pour l'étude de la pathogénie vis-à-vis des plantes.

L'actuelle classification de l'agent *R. solanacearum* est basée sur des méthodes moléculaires qui montrent que l'agent pathogène réunit un groupe de bactéries ayant une grande diversité génétique. Fegan et Prior (2005) qualifient *R. solanacearum* de « cluster d'isolats très proches génétiquement et regroupant plus d'une espèce » ; la bactérie représente donc un complexe d'espèces.

Fegan et Prior (2005) proposent un schéma de classification basé sur le regroupement des souches en groupes monophylétiques, appelés **phylotypes**. Les phylotypes sont définis par l'analyse phylogénétique des séquences de 3 portions d'ADN spécifiques :

- la **région intergénétique 16S-23S** (ITS) montrant le degré de variabilité entre souches et permettant d'évaluer leur degré de parenté (très conservée au sein des espèces) ;
- le **gène hrpB**, régulateur du gène hrp (hypersensitive reaction and pathogenicity) impliqué dans le déclenchement de réaction de défense chez les plantes attaquées par l'agent pathogène (réaction de pathogénicité ou d'hypersensibilité) ;
- le **gène egl** codant pour la synthèse de l'endoglucanase, une enzyme impliquée dans les processus de pathogénicité.

Chaque phylotype peut être divisé en groupes réunissant des souches possédant une portion hautement conservée du gène egl (<1 % de variation) appelés **séquévares**. Actuellement, quatre phylotypes et 51 séquévares ont été déterminés.

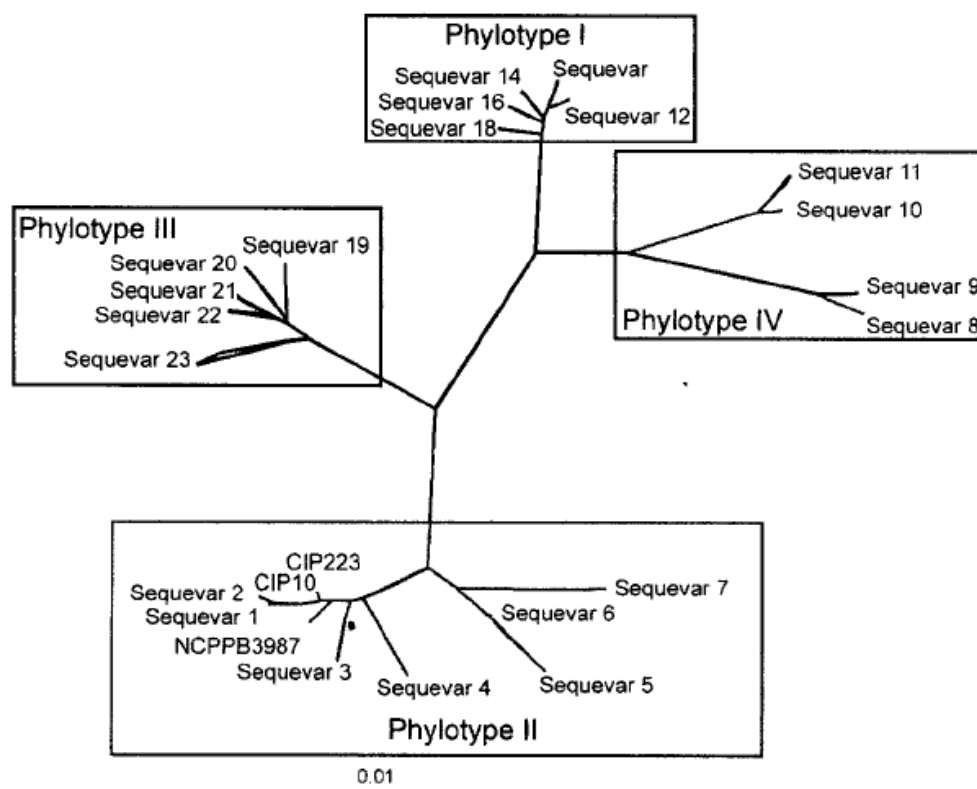
La classification des phylotypes est basée sur l'origine géographique des souches :

- **Phylotype I** : souches originaire d'Asie
- **Phylotype II** : souches originaires d'Amérique
- **Phylotype III** : souches originaires d'Afrique et des îles environnantes
- **Phylotype IV** : souches originaires d'Indonésie, d'Australie et du Japon

Ce système de classification rend mieux compte de la grande variabilité phénotypique (pathogénicité et origine géographique) observée chez l'agent *R. solanacearum*. Ce système n'est pas figé ; il peut s'enrichir afin de refléter la variabilité génétique du complexe découvert au fur et à mesure des explorations de souches peu étudiées (Fegan and Prior, 2005).

La figure 2 représente les quatre phylotypes de la classification de Fegan et Prior.





**Figure 2:** arbre phylogénétique à partir de données partielles de séquences de gènes endoglucanase

Il montre les relations phylogénétiques de séquevars et phylotypes. La branche indique une modification d'un nucléotide pour 100 nucléotides (Fegan and Prior, 2005).

## 1.2.2. L'épidémiologie du flétrissement bactérien

### 1.2.2.1. Symptomatologie

*R. solanacearum* est un agent pathogène tellurique dont les flagelles polaires lui permettent de se déplacer vers ses hôtes potentiels. Il colonise la rhizosphère des plantes hôtes et y pénètre par les blessures des racines causées par des facteurs naturels, des ravageurs du sol ou des outils. L'agent pathogène se multiplie ensuite dans la plante. Des études menées en microscopie optique et électronique montrent que la colonisation a lieu en deux phases : (1) infection des espaces intercellulaires du cortex interne racinaire, (2) envahissement des vaisseaux du xylème (Anonyme, 2007).

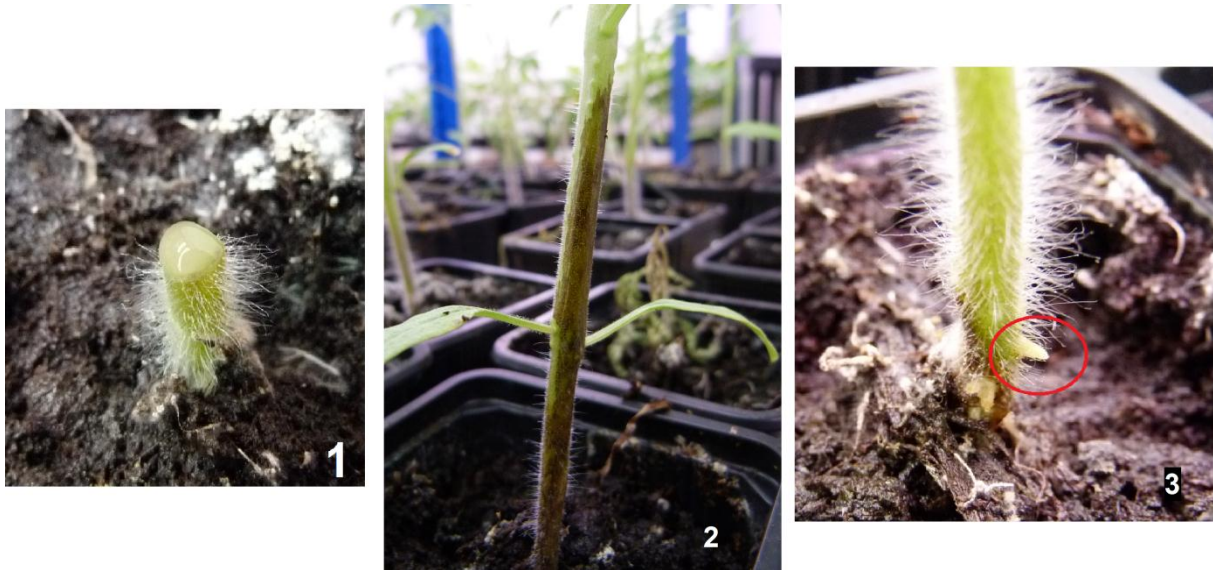
Les cellules infectées des tissus adjacents aux vaisseaux du xylème émettent des expansions vésiculeuses (thylloses) à l'intérieur desquelles migrent les bactéries. Ces thylloses s'invaginent et se rompent, libérant l'agent pathogène dans le xylème. Une fois dans les vaisseaux du xylème, la bactérie se multiplie activement et se propage dans toute la plante. Les températures chaudes (supérieures à 25°C) et un excès d'eau favorisent la multiplication et la progression de la maladie. Cette infection entraîne le flétrissement de la plante lorsque la bactérie bloque les vaisseaux du xylème, et ensuite la mort de celle-ci (Anonyme, 2007).

Chez la tomate, le flétrissement bactérien se manifeste le plus souvent par :

- la présence d'exsudats bactériens blanchâtres sortant des vaisseaux ;
- un brunissement des vaisseaux du xylème et des tiges ;



- une épinastie foliaire, l'apparition de bourrelets et de racines adventives sur la tige (Photographie 1).



**Photographie 1 :** observations des symptômes sur tomates en chambre climatique (J. Launay, 2012).

(1) exsudats bactériens blanchâtres apparus après section de la tige d'un plant de tomate flétri; (2) brunissement des vaisseaux de xylème d'une tomate ; (3) apparition de racines adventives sur la tige, au niveau du collet sur tomate

#### 1.2.2.2. Mode de conservation de *R. solanacearum*

Comme nous l'avons vu précédemment, *R. solanacearum* est une bactérie d'origine tellurique. Des recherches montrent qu'elle ne survivrait pas plus de trois mois dans les couches superficielles du sol. En revanche, elle survit dans les racines de plantes ou dans la rhizosphère des plantes hôtes ou non-hôtes ainsi que dans les couches profondes du sol durant des périodes prolongées (Graham *et al.*, 1979 ; Okabe et Fukuda, 1971). Des réservoirs d'inoculum se constituent via les plants flétris en décomposition, les débris organiques provenant d'anciennes cultures et tout le matériel végétal qui ne manifeste pas de symptôme, mais est porteur d'infection latentes.

La température est aussi un facteur clé intervenant dans la survie de *R. solanacearum* ainsi que dans l'interaction hôte pathogène (Hayward, 1991) :

- $T < 0^{\circ}\text{C}$  : la bactérie ne se maintient pas (Olsson, 1976) ;
- $0^{\circ}\text{C} < T < 10^{\circ}\text{C}$ , la bactérie peut être latente, mais ne se manifeste pas (Kelman, 1954) ;
- $30^{\circ}\text{C} < T < 35^{\circ}\text{C}$ , la bactérie est à la température optimum de croissance (sauf pour le phylotype II optimum autour de  $23\text{-}35^{\circ}\text{C}$ ).

*R. solanacearum* est en mesure de survivre à des conditions de stress (Grey et Steck, 2001). Cette bactérie peut exister dans la nature dans un état dit viable, mais non cultivable (VBNC), qui peut être considéré comme un mécanisme de dormance et de survie pour certaines bactéries qui ne produisent pas de spores. La population bactérienne qui est en état VBNC peut restaurer son état normal et retrouver sa capacité à se multiplier et à être pathogène lorsque les conditions externes deviennent plus favorables (Van Elsas *et al.*, 1997).

Enfin, l'eau est un milieu de conservation de choix pour la bactérie *R. solanacearum*. En effet, d'après Poussier (2000), elle se conserve dans l'eau et la durée de survie est variable suivant la qualité de l'eau, la température et le phylotype concerné.

#### 1.2.2.3. Mode de dissémination de *R. solanacearum*

Du fait de la capacité de la bactérie à s'adapter à de nombreux milieux, les formes réservoirs d'inoculum et les formes de dissémination sont multiples. L'Homme joue un rôle important dans la dissémination au plan local, mais aussi international.

Les différents modes de dissémination sont répertoriés de manière non exhaustive dans la liste suivante :

- **le sol** : les sols ferrallitiques très drainants sont plus réceptifs au développement du flétrissement bactérien que les vertisols (Prior *et al.*, 1998)
- **le matériel végétal** : la principale cause de dissémination de l'agent pathogène d'un pays à l'autre est le transport du matériel végétal par l'Homme, par l'utilisation des plants infectés à l'état latent (Hayward, 1991).
- **les semences** : le rôle des semences dans la conservation et la transmission de la maladie est encore peu connu. La transmission de la maladie par la graine a été démontrée, mais ce phénomène reste marginal (Poussier *et al.*, 2000).
- **la transmission mécanique** : l'Homme contribue aussi activement à la dispersion de la maladie par ses interventions culturales lors de la taille et de la récolte (Kelman *et al.*, 1998). La transmission de la bactérie d'une plante à l'autre se fait par le matériel utilisé qui n'est pas stérile.
- **transmission par les racines** : une plante flétrie génère une quantité importante de bactéries dans le substrat et contamine les autres plants voisins.
- **transmission par l'eau** : l'eau permet la dissémination et la conservation de l'agent pathogène. *R. solanacearum* est surtout présent dans les eaux riches en matière organique dans lesquelles il peut vivre plusieurs semaines (Janse et Van Puijenbroek, 1998).

#### 1.2.2.4. L'influence des paramètres biotiques et abiotiques sur *R. solanacearum*

##### ➤ L'influence de la température et de l'intensité lumineuse

Pour *R. solanacearum*, la température est le facteur principal affectant la relation hôte pathogène ; elle augmente globalement l'incidence de la maladie, mais peut aussi, pour les plus hautes températures, entraîner la mort de certaines souches.

L'augmentation de l'intensité lumineuse fait baisser la résistance de la plante, pour de hautes températures seulement, alors qu'une photopériode allongée augmente la résistance de la plante, indépendamment de la température.

##### ➤ L'influence de l'humidité et du type de sol

*R. solanacearum* présente une grande sensibilité au type de sol : certains sols sont peu soumis à la maladie ; c'est le cas des sols suppressifs (sols où certaines maladies sont évitées par de la présence de microorganismes antagonistes à l'agent pathogène). A contrario, les sols argileux favorisent la maladie ; l'agent pathogène se développant mieux dans les sols humides que dans les sols secs.

### ➤ L'influence de la population de nématodes

Il a été observé une synergie entre l'activité des nématodes à galles (*Meloidogyne incognita*) et *R. solanacearum* (Deberdt *et al.*, 1999 ; Hayward, 1991). L'activité galligène du nématode endommage les tissus racinaires induisant une forte sensibilité de la plante. Les blessures causées par les nématodes sur les racines permettent à *R. solanacearum* de pénétrer dans la plante.

### ➤ La forte sensibilité des sols tropicaux au flétrissement bactérien.

Le climat tropical est particulièrement propice au développement des maladies telluriques. La chaleur et l'humidité favorisent le développement d'agents pathogènes et en particulier celui de *R. solanacearum*. Le sol ne bénéficiant pas du rôle assainissant de l'hiver des régions tempérées, il peut être cultivé toute l'année n'incitant pas à la mise en place de rotations assainissantes.

### 1.2.3. Une nouvelle souche émergente qui inquiète

En 1998, les productions d'*Anthurium* et de Cucurbitacées ainsi que des espèces d'Héliconias et de certaines adventices ont été fortement affectées par une nouvelle population de *R. solanacearum* appartenant au phylotype II/4NPB. En 1999, elle est isolée pour la première fois en Martinique (Wicker *et al.*, 2009).

Cette population est génétiquement très proche de la maladie de Moko, flétrissement bactérien sur bananier, mais n'est cependant pas pathogène sur cette plante. Cette nouvelle population se caractérise par la colonisation de nouveaux hôtes et se répand rapidement dans toutes les zones de production maraîchères. Dès 2003, les souches du phylotype IIB/4NPB représentaient déjà 30 % des isolats de *R. solanacearum*, sur cultures de solanacées en Martinique (Wicker *et al.*, 2009).

Le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* phylotype II/4NPB, l'étendue de son spectre d'hôtes (notamment des espèces d'importance économique et alimentaire) et sa capacité de dissémination et d'adaptation font de cette bactérie un agent pathogène très dangereux. En France, *R. solanacearum* est un agent de quarantaine et aux États-Unis, il est référencé comme agent de bioterrorisme.

Le flétrissement bactérien causé par cet agent pathogène constitue donc un frein important à la production dans des systèmes agricoles et des régions diverses (Wicker *et al.*, 2009).

### 1.2.4. Le flétrissement bactérien en Guyane

Les premières identifications de l'agent *R. solanacearum* datent des années 1960. En 1966, Bernard Digat, chercheur à l'INRA, isole 4 souches bactériennes sur plants de tomate, de poivron et d'aubergine qu'il identifie formellement comme étant l'agent *Pseudomonas solanacearum* (Digat, 1967). Une dizaine d'années plus tard, il isole une autre souche de *R. solanacearum* en Guyane et cette dernière devient l'organisme modèle de l'étude de l'équipe du chercheur C. Boucher de l'INRA Toulouse.

Le génome de la souche, nommée **GMI1000**, sera le premier à être séquencé entièrement. Le séquençage et l'annotation du génome complet de cette souche ont été une réalisation majeure et a contribué au développement de ressources génomiques pour l'étude des déterminants du pouvoir pathogène de cette bactérie. GMI1000 est une souche hôte large gamme isolée à l'origine sur la tomate en Guyane (Genin and Boucher, 2004).

Dans les années 1980, bien que le flétrissement bactérien soit un problème important en Guyane, aucune étude décrivant l'impact économique et agricole de cette maladie n'a été réalisée. Des prélèvements effectués par le service de la protection des végétaux de la DAAF et par la FREDON, des années 1980 à nos jours, attestent de la présence du flétrissement bactérien en Guyane (tableau 2). Cependant, rares sont les souches phylotypées.

Ce n'est qu'en décembre 2010 que l'existence du phylotype II/sequevar 4NPB a été mise en évidence sur solanacées, en Guyane (Deberdt, 2010).

date de prélèvement	Lieu	plante hôte	phylotype/obs	déterminé par
1983	ND	Aubergine	ND	GRISP Antilles-Guyane
1990	ND	Poivron	ND	GRISP Antilles-Guyane
1994	ND	Anthurium	ND	GRISP Antilles-Guyane
2006	Montsinéry	Bananier	IIB/4	GRISP Antilles-Guyane
2007	Cacao	Bananier	IIB/4	LNPV Angers
2007	Montsynéry	Bananier	IIB/4	LNPV Angers
2010	Matiti, Javouhey	aubergine, tomate, pourpier	I, IIB/4NPB, II	PRAM-CIRAD Martinique
2009-2011	prélèvements de routine de la FREDON	Solanacées	ND	FREDON, analyse par flash kit

**Tableau 2 :** liste des prélèvements de *R. solanacearum* réalisés en Guyane de 1983 à nos jours (source : DAAF, SPV)

ND : non déterminé, IIB/4 : phylotype II clade B séquévar 4, IIB/4NPB : II clade B séquévar 4NPB.

La caractérisation génétique d'une collection établie en 2011 en Guyane (Noreskal, 2011), prélevée sur Solanacées, a montré la coexistence de deux populations de *R. solanacearum* :

- une **population « historique »** identique à celle connue depuis les années 1960, inféodée aux Solanacées ;
- la **population « émergente »**, phylotype II/4NPB.

En Martinique, cette population émergente s'est avérée plus agressive sur tomate que la population historique et sévit sur une plus large gamme d'hôtes tels que les cucurbitacées (Wicker *et al.*, 2007).

De ce contexte, il est indispensable de développer des stratégies de lutte agroécologique pour combattre le flétrissement bactérien.

### 1.2.5. Les méthodes de lutte contre le flétrissement bactérien

#### 1.2.5.1. La lutte génétique

La résistance variétale reste la stratégie de choix pour lutter contre le flétrissement bactérien (Hayward, 1991). Elle consiste à identifier les sources de tolérance et de résistance adaptées aux conditions climatiques de la zone de production. La procédure consiste à repérer, parmi les collections de ressources génétiques, les géniteurs de résistance : cela nécessite de réaliser des tests d'évaluation, de rechercher les facteurs génétiques (gènes ou QTLs, Quantitative Trait Loci) impliqués dans la résistance puis d'introgresser ces facteurs génétiques dans les

fonds génétiques sensibles, mais à haute valeur agronomique (Carmeille *et al*, 2006 ; Wang *et al*, 1998).

Face à la diversité des agents pathogènes, les plantes ont développé des systèmes de défense leur permettant de s'adapter aux attaques des organismes pathogènes en variant la nature des réponses, constitutives ou inductibles. Malgré l'existence de barrières constitutives (paroi végétale, métabolites secondaires antimicrobiens, etc.) conférant à la plante une résistance plutôt générale avec différents degrés d'efficacité, l'induction de défenses plus spécifiques à chaque classe d'agent pathogène est souvent nécessaire. Ainsi, les plantes ont élaboré des stratégies de défense naturelle contre différents stress biotiques, régulés par des mécanismes de défense (Lebeau, 2010).

La résistance d'une plante vis-à-vis d'une maladie donnée dépend de sa capacité à reconnaître le(s) signal(aux) produit(s) par l'agent pathogène, en particulier dans la phase précoce de l'infection. Les événements qui président à la mise en place de la résistance de la plante sont successivement :

- la reconnaissance de molécules produites par l'agent pathogène pendant l'infection ;
- la mise en place d'une signalisation capable de transformer la reconnaissance initiale en signal intracellulaire conduisant à ;
- l'expression des gènes impliqués dans diverses réponses cellulaires liées à la résistance aux maladies.

La cinétique de cette signalétique est importante dans la résistance des plantes, car une détection trop lente est souvent la cause de la sensibilité de l'hôte (Lebeau, 2010).

#### 1.2.5.2. [La lutte chimique](#)

Des travaux de désinfection des couches superficielles du sol par l'application de fumigants comme le formol, l'hypochlorite de calcium ou le bromure ont été réalisés à La Réunion (Anonyme, 2007).

En culture sous serre, les résultats de ces essais se sont montrés efficaces : la maladie a été éradiquée de façon temporaire.

Cependant en plein champ, l'efficacité s'est avérée limitée dans le temps surtout lorsque l'infection du sol par les populations de *R. solanacearum* est élevée.

De plus, ces produits provoquent de nombreux effets indésirables sur l'environnement et mettent en danger l'équilibre de la biodiversité des sols (Anonyme, 2007).

#### 1.2.5.3. [Les rotations et associations de cultures](#)

Les rotations culturales avec des plantes non hôtes peuvent être efficaces pour diminuer les populations bactériennes du sol et permettre ainsi une biodésinfection du sol via la rupture du cycle infectieux de l'agent pathogène. Son efficacité varie selon le phylotype de *R. solanacearum* présent et nécessite souvent une culture de plantes non hôtes sur plusieurs années.



Les rotations /associations culturales peuvent se faire avec des plantes de service utilisées comme engrais vert ou cultures de couverture :

- **à effet direct** : les plantes agissent comme barrières allélopathiques contre les agents pathogènes telluriques via l'émission de substances racinaires qui, d'une part, favorisent l'induction de la résistance chez la plante et d'autre part, ont un effet biocide, ce qui entraîne la mort de l'agent pathogène.
- **à effet indirect** : les plantes agissent sur l'environnement de l'agent pathogène en favorisant le développement de populations microbiennes qui vont entrer en concurrence avec lui. Des études ont démontré l'existence de bactéries antagonistes à *R. solanacearum* (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*) qui occupent la même niche écologique et qui entrent en compétition avec elle. (Saddler, 2005 ; Hayward, 1991).

D'autres études sur le potentiel assainissant de plantes de service utilisées en interculture et sur l'effet anti-microbien de leurs extraits végétaux ont été réalisées au CIRAD-PRAM (Deberdt *et al.*, 2012). *L'Allium fistulosum*, le *Crotalaria spectabilis* et le *Crotalaria juncea* ont montré des résultats intéressants, réduisant de manière significative l'incidence du flétrissement bactérien sur les plantes. Ces plantes sont utilisées dans le cadre de notre expérimentation d'une méthode de lutte.

Les **crotalaires** présentent de nombreux avantages agronomiques : elles appartiennent à la famille des légumineuses, s'adaptent à de nombreux types de sols et sont compétitrices directes des adventices. Elles sont souvent utilisées comme engrais vert. Ces plantes ont une croissance rapide et donnent des plants robustes, capables de fournir une bonne couverture au sol permettant ainsi de lutter contre l'érosion.

Des travaux menés sur *Crotalaria juncea* et *Crotalaria spectabilis* montrent leur statut non-hôtes pour un large panel d'agents pathogènes et plus précisément, pour le genre *Meloidogyne* (Germani *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002).

Les Crotalaires sont utilisées pour leur effet nématocides, essentiellement en Amérique du Sud et en Inde (Regnault-Roger *et al.*, 2008). La plupart de leurs organismes cibles sont les nématodes endoparasites comme *Meloidogyne* ssp mais aussi *Rotylenchulus reniformis* (principal ravageur de l'ananas en Martinique) et *Radophylus similis* (ravageur de la banane). Mais malgré la grande utilité agronomique du genre *Crotalaria* et la preuve de son effet nématocide, peu d'études ont été réalisées sur l'effet de *Crotalaria* ssp sur *R. solanacearum*. Une étude, réalisée en condition de serre, a néanmoins montré que la combinaison de tissus frais de *Crotalaria juncea* et de *Cajanus cajan* (pois d'angole) incorporés dans un sol infecté, et laissés en incubation pendant 2 mois, avait permis de contrôler le flétrissement bactérien (100 % du flétrissement bactérien contrôlé avec 20-30 % de plantes incorporées dans le sol) (Cardoso *et al.*, 2006).

Suite aux recherches effectuées au PRAM, *C. spectabilis* est caractérisée comme une espèce qui héberge *R. solanacearum* à faible densité et réduit significativement la population bactérienne dans la rhizosphère. *C. juncea* est également une espèce qui héberge *R. solanacearum* à faible densité et qui n'a pas montré d'effet multiplicateur sur les populations de *R. solanacearum* dans le sol rhizosphérique.

La **cive**, nom vernaculaire d'*Allium fistulosum* en Guyane, est largement cultivée dans cette région. Elle présente un intérêt commercial non négligeable.

Les effets des plantes de la famille des *Allium* ssp sur la santé humaine sont connus depuis longtemps (diminution des cancers gastro-intestinaux, des tumeurs, etc.). Généralement, les

molécules bénéfiques à la santé humaine ont montré *in vitro* un fort potentiel phytosanitaire insecticide, bactéricide, acaricide, nématocide et fongicide (Arnault *et al.*, 2005).



**Photographie 2** : *Allium fistulosum* (Launay, 2012)

Yu *et al* (1999) ont démontré que l'association tomate/*Allium tuberosum* diminuait l'incidence du flétrissement bactérien sur la tomate. Deberdt *et al* (2012) ont également démontré l'effet suppressif d'extraits aqueux d'*Allium fistulosum* sur les populations de *R. solanacearum* dans un sol naturel.

Actuellement de nombreuses études sont menées, que ce soit en Martinique ou en Guyane, dans le but de sélectionner des plantes de service susceptibles d'être introduites en rotation culturale (culture de courte durée entre 2 cultures), ou en culture associée.

#### 1.2.5.4. [Les autres moyens de lutte](#)

**Lutte physique** : la solarisation associée à la biofumigation a montré son efficacité (Gorissen *et al.*, 2004 ; Schonfeld, 2003). La solarisation permet, par la mise en place de bâche sur le sol, une augmentation de sa température et permet une diminution, à court terme, de la pression des populations de *R. solanacearum*.

**Amendements** : Les amendements organiques (boue de station d'épuration, bagasse de canne à sucre, etc.) diminuent la prévalence de la bactérie dans le sol grâce à la production de substances toxiques.

L'efficacité de ces techniques est très variable, car elle dépend fortement des facteurs physico-chimiques du sol, des facteurs climatiques et du facteur « souche » de *R. solanacearum*.

### **1.3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

---

La demande des maraîchers est de plus en plus forte pour trouver une solution au problème du flétrissement bactérien, principal frein au développement de la culture de Solanacées en Guyane.

Pour répondre de manière durable à cette problématique, le CIRAD-UR 106- Guyane s'est associé, en 2011, à l'UR HORTYS – Martinique et l'UMR PVBMT – Réunion, le Service de l'Alimentation (SALIM) de la DAAF, la FREDON (Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles) et l'Etablissement Public Local d'Enseignement et de Formation Professionnelle Agricole (EPLEFPA) de Macouria, pour trouver des solutions.

Un premier stage a été effectué en 2011 et a permis de caractériser les pratiques agricoles et de constituer une collection de 174 souches de *R. solanacearum* dont 124 ont été phylotypées par typage moléculaire au CIRAD-PRAM. En parallèle, des essais variétaux et des méthodes de lutte par solarisation ont été réalisés (Noreskal, 2011).

Mon stage s'inscrit dans la continuité de ce projet de recherche et développement et a pour but d'étudier la faisabilité d'une méthode de lutte innovante et agroécologique contre le flétrissement bactérien en Guyane.

Pour se faire, il est nécessaire :

**1. d'étudier la diversité génétique de *R. solanacearum* à partir de la collecte de souches sur solanacées, chez les agriculteurs.**

Le but est d'approfondir les connaissances sur le flétrissement bactérien en Guyane et de compléter la collection de souches de *R. solanacearum* débutée en 2011. Cette recherche consiste à prospecter des zones géographiques inexplorées et à réaliser des prélèvements sur des parcelles avec de nouveaux précédents culturaux.

Ce travail est réalisé en étroite collaboration avec les techniciens de la chambre d'agriculture et des organisations professionnelles agricoles, et le Service de l'Alimentation de la DAAF. Le typage moléculaire des souches de *R. solanacearum* en provenance de Guyane est réalisé au laboratoire de phytopathologie du PRAM (Martinique).

Les hypothèses qui devront être vérifiées sont les suivantes :

- **seuls les phylotypes I et II sont présents en Guyane.** Cette hypothèse est basée sur le fait que d'une part l'une des premières souches de *R. solanacearum*, GMI1000, isolée en Guyane par Digat dans les années 1970 est une souche de phylotype I séquévar 12 (Fegan et Prior, 2005) (cf. partie 1.2.5) ; et d'autre part, que le phylotype II a été majoritairement identifié dans les pays du continent américain (Honduras, Hawaï, Pérou, Colombie, Costa Rica, États unis, Panama) (Fegan et Prior, 2005).
- **les souches avec un précédent forêt ont une faible diversité phylotypiques et sont représentatives des populations « historiques » de *R. solanacearum*.**

**2. d'étudier le pouvoir pathogène de souches de *R. solanacearum* représentatives de la collection guyanaise.**

Dans le cadre de ce programme de recherche collaboratif, le but est d'acquérir des connaissances sur le pouvoir pathogène des souches locales guyanaises afin de développer un programme de recherche visant à définir une stratégie de gestion durable de la maladie.

L'évaluation du pouvoir pathogène est réalisée sur deux variétés de Solanacée (plus ou moins résistantes à la maladie) et sur une variété de Cucurbitacée.

Cette expérimentation devra permettre de vérifier les hypothèses suivantes :

- **les souches émergentes sont plus agressives et plus virulentes que les souches historiques ;**
- **l'agressivité et la sévérité du flétrissement bactérien sur Solanacées varient selon la résistance induite par les variétés utilisées ;**
- **les risques épidémiologiques sont variables selon les combinaisons « Souche\*Variété » ;**



- **seules les souches émergentes entraînent du flétrissement bactérien chez les Cucurbitacées.**

Ces hypothèses sont basées sur les résultats de l'étude phytopathologique réalisée par Wicker *et al.* (2007).

### **3. de tester l'efficacité d'une méthode agroécologique de lutte contre le flétrissement bactérien.**

Il s'agit de mettre en place, dans le contexte guyanais, une méthode de biodésinfection des sols par l'introduction de plantes de service-modèles préalablement sélectionnées dans le cadre du programme de recherche de l'UR HORTSYS conduit au laboratoire de phytopathologie du PRAM ; l'efficacité de ces plantes de service sur le flétrissement bactérien ayant déjà été démontrée. L'expérimentation est réalisée à l'EPPLEFPA de Macouria, en plein champ, dans un sol naturellement infesté par *R. solanacearum*. L'objectif est d'évaluer l'effet d'un précédent cultural « plantes de service » sur, d'une part le contrôle du flétrissement bactérien et d'autre part sur le développement végétatif de l'aubergine et sur la production.

Cet essai vise à démontrer les hypothèses suivantes :

- **les plantes de service réduisent le potentiel infectieux du sol en *R. solanacearum* ;**
- **les plantes de service jouent le rôle d'engrais vert.**

Ces hypothèses sont basées sur les résultats obtenus lors d'une expérimentation similaire réalisée en Martinique (Mathurin, 2012).

## 2. ÉTUDE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN EN GUYANE ET PROPOSITION D'UNE MÉTHODE DE LUTTE INNOVANTE

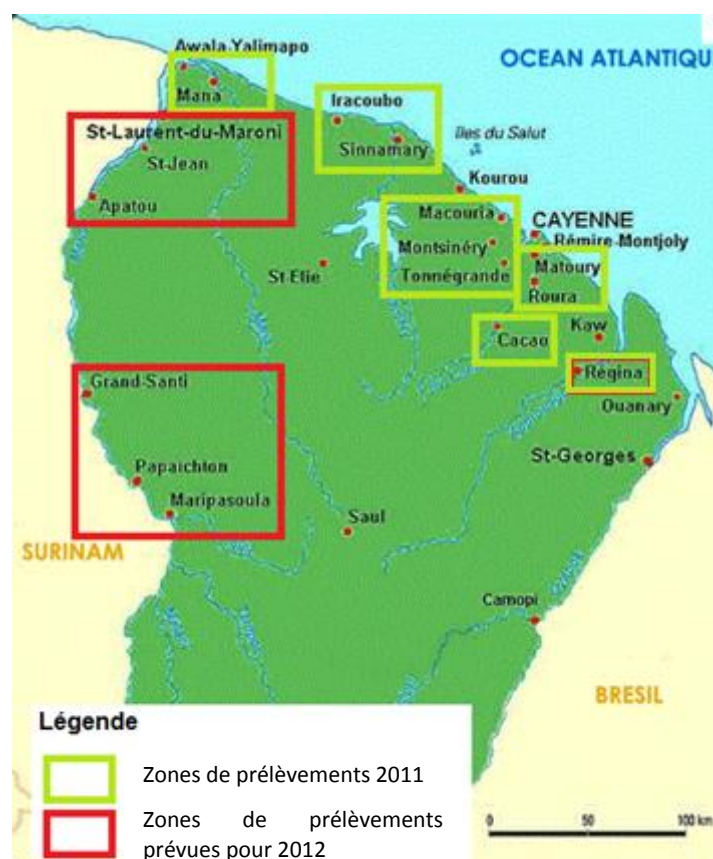
### 2.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1.1. Le matériel biologique

##### 2.1.1.1. La bactérie *R. solanacearum*

##### ➤ Les nouvelles souches de *R. solanacearum* prospectées

Les prélèvements de 2011 ont été localisés dans l'Est guyanais et sur la bande littorale. Les nouvelles zones à prospecter pour 2012 se situent dans l'Ouest de la Guyane : St Laurent du Maroni, Apatou, Papaïchton, Grand Santi et Maripasoula (Figure 3) afin de compléter la collection de souches.



**Figure 3 :** carte des zones de prélèvements de souches Rs réalisés en 2011.et zones de prélèvement prévues en 2012.

Lors des prospections menées en 2011, aucune souche n'a été prélevée après un précédent « forêt ». Aussi il a été décidé de se pencher sur cette modalité.

Des tomates pièges ont été plantées chez quatre producteurs situés dans le secteur de Corosony (commune de Régina) et de Cacao et dans une parcelle située sur la station expérimentale du CIRAD à Combi (zone littorale, commune de Sinnamary).



**Photographie 3** : plantations de tomates pièges chez les producteurs (J. Launay. 2012).  
 (1) placette de 9 plants de tomates géoréférencée chez Ly Daoly à Cacao; (2) placettes sur la parcelle de Mme Wang Mayly défrichée en octobre 2011 à Corossony 2.

Cette prospection est complétée par des prélèvements sur une parcelle d'aubergines cultivée directement après déforestation dans le secteur de Risque Tout (Commune de Montsinéry).

Le tableau 3 présente les cinq exploitations récemment défrichées.

N° Exploitation Nom de l'exploitant Coordonnées	Zone de prélèvement	Date de déforestation	Commentaires
Exploitation n°1, <b>E1</b> VICTOR Jean René	Risque Tout – commune de Montsinéry	2011	Mise en place d'une culture d'aubergines juste après défriche
Exploitation n°5, <b>E5</b> LY Daoly 0594 27 01 78	Cacao	Octobre 2010	Entretien de la parcelle, mais aucune culture mise en place
Exploitation n°6, <b>E6</b> CIRAD	Combi	Octobre 2011	Zone « déforestée » pour la mise en place d'un projet de caféiculture.
Exploitation n°7, <b>E7</b> YANG Mayly 0594 37 08 78	Corossony 2 – commune de Régina	Juillet 2011	Coupée et brûlé en juillet 2011 et trons enlevés en Octobre 2011
Exploitation n°8, <b>E8</b> TCHA Pierre 0594 37 03 84	Corossony 2 – commune de Régina	2009	Entretien tous les ans, mais pas de mise en place de culture depuis la défriche : les « tomates pièges » sont les premières cultures.

**Tableau 3** : détails des 5 exploitations choisies pour avoir un précédent forêt

➤ La collection représentative des populations de *R. solanacearum* guyanaises

Le pouvoir pathogène de sept souches de *R. solanacearum*, représentant la collection des souches de Guyane, est évalué sur Solanacée et Cucurbitacée. Elles ont été isolées en 2011 par Noreskal (2011) et génotypées au laboratoire de phytopathologie du PRAM (tableau 4).

Le choix des 7 souches est basé sur trois critères :

- la **zone géographique** : trois zones ont été définies. La zone 1 correspond à l'Ouest guyanais, la zone 2 à la partie littorale située entre Kourou et Cayenne et la zone 3 à l'Est guyanais (cf. annexe 1) ;
- le **phylotype** : les quatre phylotypes/séquévares référencés en Guyane ont été choisis ;
- l'**hôte d'origine** : les principales cultures guyanaises attaquées par la bactérie sont représentées (tomate, aubergine, poivron et concombre).

Phylotype/séquévar	Souche	Hôte d'origine	Commune
II/4NPB	E2PO3	Capsicum annuum	Cacao (zone 3)
II/4NPB	E7A1	Solanum melongena	Wayabo (zone 2)
II/seq1&2	E14A6	Solanum melongena	Corossoni 1 (zone 3)
I	E16A2	Solanum melongena	Javouhey (zone 1)
II/4NPB	E2CO2	Cucurbita pepo	Cacao (zone 3)
II	E18T2	Solanum lycopersicon	Montsinéry (zone 2)
II/4NPB	E19T2	Solanum lycopersicon	Corossoni 1 (zone 3)

**Tableau 4** : Liste des souches testées pour l'évaluation du pouvoir pathogène.  
Avec T : tomate, A : aubergine, CO : concombre, PO : poivron et E : exploitation

#### ➤ La population de *R. solanacearum* naturellement présente

Un essai en plein champ est réalisé sur la parcelle expérimentale de l'EPLEFPA de Macouria. Il s'agit d'une parcelle sortant d'une jachère, anciennement infestée par *R. solanacearum*. La présence des souches sur cette parcelle a été confirmée par phylotypage au laboratoire de phytopathologie du PRAM.

#### 2.1.1.2. Les plants bioindicateurs du flétrissement bactérien

Pour le bioindicateur « Tomate », les 4 variétés utilisées sont :

- **Variété Heat Master** pour les tomates pièges (13 blocs de 9 tomates, sur chacune des quatre parcelles choisies) et pour le témoin sensible lors de la phase 2 de l'expérimentation en plein champ ;
- **Variété « CARAÏB, improved Bacterial wilt tolerant variété »** pour multiplier et homogénéiser l'inoculum naturel du sol, lors de la phase 1 de l'expérimentation en plein champ ;
- **Variété Hawaii 7996** : variété référencée dans la collection internationale ayant une résistance assez élevée à l'agent pathogène (Lebeau A., 2010) ;
- **Variété L390** : variété référencée dans la collection internationale ayant une sensibilité forte à la maladie (Lebeau A., 2010).

Les tomates sont semées en pépinière sur du terreau universel (FLORADAR, Agrosystem) non stérile et sont repiquées en pots au stade 2 feuilles (soit 10 jours après semis).

Pour le concombre, c'est la variété **Euréka** qui est testée. Cette variété commerciale est choisie, car elle est connue pour sa sensibilité vis-à-vis des populations de souche émergente

de *R. solanacearum* (Wicker *et al.*, 2005). Les concombres sont semés directement en pots dans le même terreau non stérile.

En plein champ, les aubergines, variété « **Kalenda** », sont choisies comme « bioindicateur plante » pour évaluer l'effet de chaque traitement.

#### 2.1.1.3. Les plantes de service utilisées

Les plantes de service testées sont 3 espèces à cycle long (70 jours) :

- deux Fabacées, *Crotalaria juncea* cv.IAC-1 et *Crotalaria spectabilis* ;
- une Alliace, *Allium fistulosum* (cives).

Ces plantes ont été sélectionnées sur la base des résultats acquis par l'équipe de phytopathologie du PRAM.

#### 2.1.2. Isolement des souches de *R. solanacearum*

Les prélèvements sont réalisés sur plants exprimant des symptômes de flétrissement bactérien.

Chaque plant malade est prélevé entièrement avec ses racines sur le terrain et acheminé au laboratoire en évitant les contacts entre les différents plants grâce à des sachets individuels. Les échantillons sont traités le jour même.

À l'aide d'outils stériles, un segment de tige de 3-5 cm est prélevé au niveau du collet. Sous une hotte à flux laminaire, le fragment est trempé dans de l'alcool à 95° puis flambé pour stériliser sa surface. L'extraction des bactéries se fait par dilacération des tissus et elles sont ensuite mises à incuber dans une solution tampon pendant 15 à 20 minutes. Une solution bactérienne est prélevée avec une anse de 10µL et étalée en trois secteurs sur milieu semi-sélectif, SMSA. Chaque boîte de Pétri est identifiée par l'exploitation d'origine et le numéro du plant.

Après 48 h d'incubation à 28°C, on prélève une colonie typique de *R. solanacearum* sur le milieu SMSA que l'on repique sur un milieu de culture non sélectif, le milieu CPG. Le descriptif des 3 milieux est disponible en annexe 11.

Après 24h d'incubation à 28°C, on prélève à l'aide d'une anse de 1µL, 1 à 2 colonies purifiées qui seront conservées à température ambiante, dans un tube eppendorf rempli d'eau distillée stérile. Le protocole est détaillé en annexe 2.

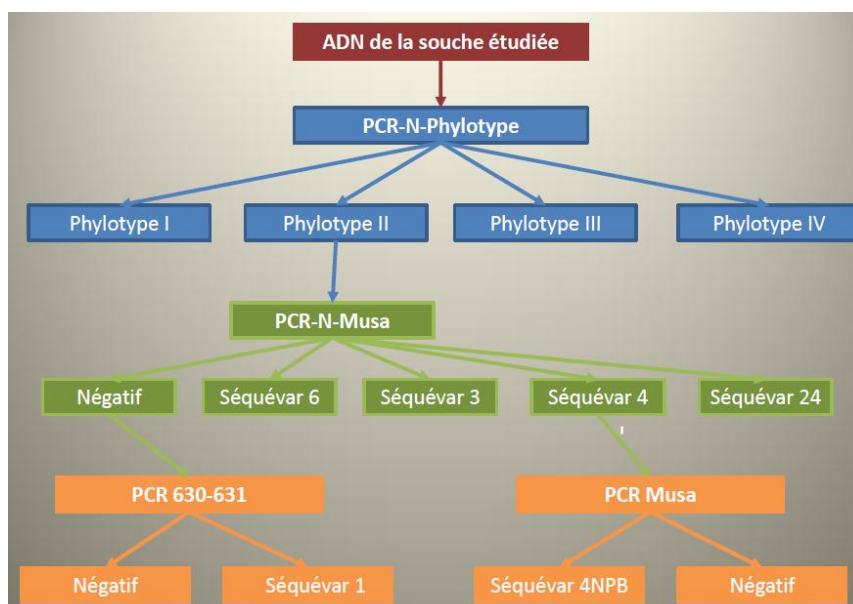
#### 2.1.3. Typage moléculaire des souches de *R. solanacearum*

Le phylotypage des souches isolées et purifiées s'est déroulé au laboratoire de phytopathologie du CIRAD-PRAM de la Martinique (responsable Péninna Deberdt). Il permet de caractériser la diversité génétique des souches selon la nouvelle classification de Fegan et Prior (2005).

Les méthodes moléculaires employées pour le phylotypage sont la multiplex-PCR, suivie d'une migration sur gel d'électrophorèse et d'une révélation. La phylotype-multiplex-PCR (pmx-PCR) amplifie de manière spécifique des fragments d'ADN situés dans la région ITS 16S-23S. Le produit de l'amplification donne des amplifiats de tailles spécifiques à chaque phylotype. Après PCR, les amplifiats sont déposés sur un gel à électrophorèse où ils migrent en fonction de leur taille. En comparant la position des amplifiats sur le gel avec un étalon, on peut en déduire le phylotype des souches étudiées.



Sur le même principe, des PCRs spécifiques permettent de détecter les séquévars 3, 4, 6 ou 24 (groupe moko), le séquévar 1 et enfin le séquévar 4NPB. La figure 4 rend compte des différentes PCR utilisées pour la caractérisation des séquévars et des phylotypes. Le jeu d'amorces, les caractéristiques des amplifiats et migrations sur gel sont disponibles en annexe 3.



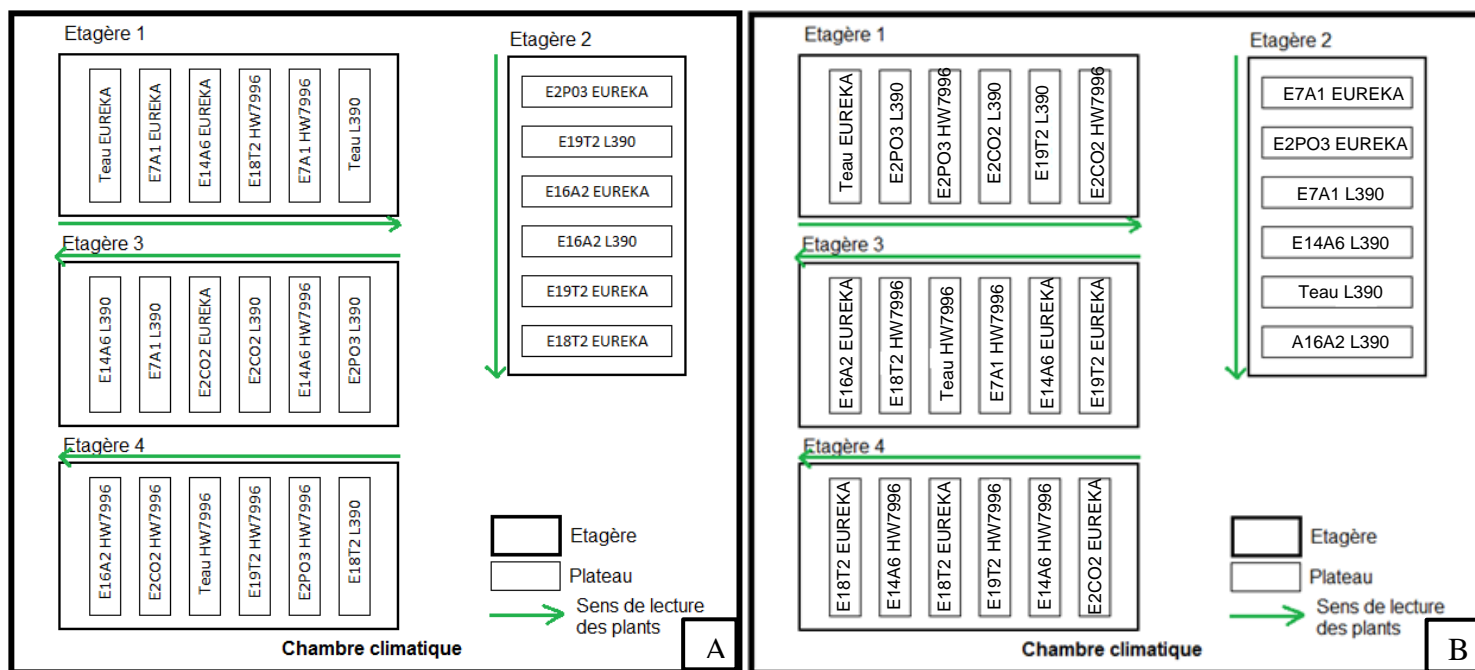
**Figure 4 :** les différentes PCR utilisées pour caractériser les différents phylotypes et séquévars selon Fegan et Prior (2005).

#### 2.1.4. Dispositif expérimental pour l'évaluation du pouvoir pathogène

L'expérimentation est réalisée en chambre climatique sur 288 plants (96 plants de chaque variété par répétition) avec une humidité moyenne de 80%, une photopériode de 14 heures et une température de nuit de 25°C et de jour 30 +/- 2°C.

L'inoculation se fait au stade 3 à 4 feuilles pour les cultivars de tomates et au stade 2 à 3 feuilles pour le cultivar de concombre. Après scarification des racines (réalisée à l'aide d'une lame de scalpel), on dépose un volume de 5 mL\*10<sup>8</sup> CFU d'inoculum en surface du sol, autour de chaque plant (le protocole de préparation d'un inoculum titré est disponible en annexe 4).

Le dispositif est constitué de 2 répétitions. Pour chaque répétition, l'ensemble des modalités variété\*souche est testé sur 12 plants, lors de la première répétition. Lors de la seconde répétition, seulement 10 plants de tomate par combinaison et 12 plants de concombre sont mis en place. Les différentes modalités sont disposées en randomisation totale sur 4 étagères. Les deux répétitions sont réalisées dans le temps (1 répétition = 1 date). Le plan d'expérimentation est présenté dans la figure 5.



**Figure 5 :** plan de la répartition des combinaisons souche\*cultivar en chambre climatique.  
(A) Répétition 1 et (B) Répétition 2

Le suivi des plants flétris se fait trois fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi) durant 28 jours après inoculation pour les Solanacées et pour les Cucurbitacées. La notation se fait plante à plante selon l'échelle de Coupat-Goutaland *et al.* (2011) (Photographie 3) :

- 0 : absence de flétrissement ;
- 1 : une feuille flétrie ;
- 2 : deux-trois feuilles flétries ;
- 3 : au moins 75 % des feuilles flétries, mais tige droite ;
- 4 : tige pliée, plante morte.

On notera 5 les plants morts d'autres maladies.



**Photographie 4** : illustration de la notation des plants selon l'échelle de Coupat-Goutaland et al., 2011 (J. Launay, 2012).

0 : plant non flétri, 1 : une feuille flétrie, 2 : deux-trois feuilles flétries, 3 : au moins 75 % des feuilles flétries, mais tige droite, 4 : tige pliée, plante morte.

Au début de l'expérimentation, les premiers plants flétris sont prélevés pour isolement de la souche de *R. solanacearum*.

À la fin de l'expérimentation, des isollements microbiologiques sont réalisés à la base des tiges, sur tous les plants sans symptômes, pour diagnostiquer les infections latentes.

Le protocole complet est en annexe 5.

#### 2.1.5. Dispositif expérimental de la méthode de lutte agroécologique

Le but est de mettre en évidence la capacité des plantes de service à assainir le sol et limiter le développement de *R. solanacearum*.

Cinq modalités ont été mises en place sur la parcelle expérimentale : 2 témoins et 3 plantes de service. La mise en place d'une interculture entre deux cycles de solanacées est simulée. Les traitements sont les suivants :

- **témoin sensible** « Tomate » ;
- **témoin « sol nu »** constitue le témoin sans plante.
- **Modalité 1** : *Crotalaria spectabilis* mise en place en interculture ;
- **Modalité 2** : mélange d'espèces *Crotalaria spectabilis* et *Crotalaria juncea* cv.IAC-1 mise en place en interculture ;
- **Modalité 3** : *Allium fistulosum* (cive) mise en place en interculture et qui présente aussi un intérêt commercial en Guyane.

Les plantes sont semées en plein champ. Seules la cive et les tomates sont transplantées.

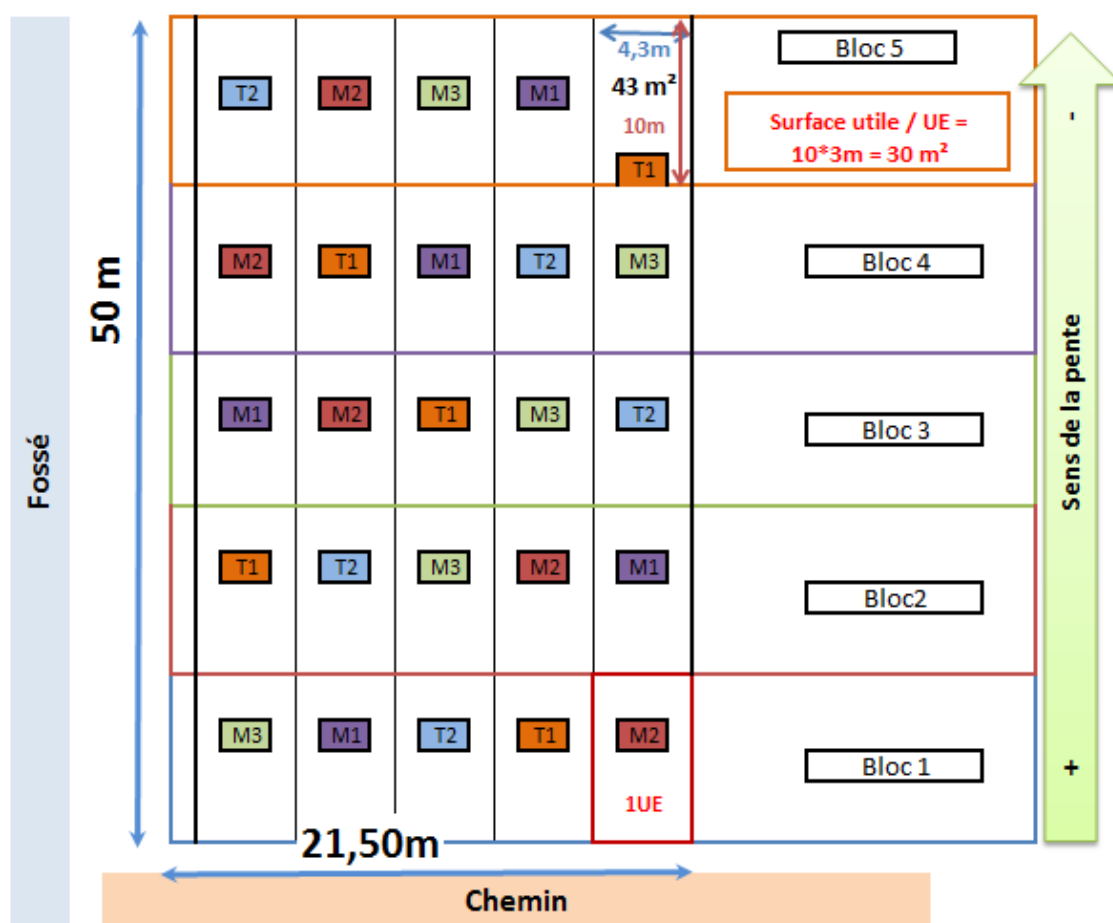


L'aubergine est choisie comme « bioindicateur plante » pour évaluer l'effet de chaque traitement.

L'expérimentation se déroule en 3 phases :

- **phase 1** : homogénéisation des populations indigènes de *R. solanacearum* sur la parcelle expérimentale. Des plants de tomates cv. Heat Master sont mis sur toute la parcelle afin de propager les populations bactériennes (1 mois).
- **phase 2** : installation des cinq modalités sur la parcelle. L'interculture est laissée 70 jours. À la fin de cette période, les Crotalaires sont broyées et laissées en mulch sur la parcelle durant 35 jours. Les tomates sont arrachées et les cives sont arrachées et parées sur la parcelle.
- **phase 3** : évaluation des effets assainissant des différentes plantes de service en interculture et de leur mulch sur l'expression du flétrissement bactérien, sur la croissance végétative et sur le rendement en aubergines. Les cives, ayant un intérêt commercial, sont re-transplantées en association avec les aubergines.

Le dispositif expérimental est un dispositif en blocs randomisés, avec 5 blocs (correspondant à 5 répétitions) : chaque bloc est composé des 5 modalités disposées de manière aléatoire. Chaque unité expérimentale (UE) fait 43 m<sup>2</sup> dont 30m<sup>2</sup> de surface utile. La mise en place des cultures se fait sur billons (Figure 6).



**Figure 6 :** dispositif expérimental avec 5 traitements et 5 répétitions.

M1 : *Crotalaria spectabilis*, M2 : *Crotalaria spectabilis* + *Crotalaria juncea*, M3 : *Allium fistulosum*, T1 : témoin « Tomate », T2 : témoin « sol nu »

Le suivi est réalisé sur 20 plants d'aubergine par unité expérimentale (soit un total de 100 plants par modalité). Le nombre d'aubergines flétries est enregistré 2 fois par semaine. Le développement végétatif est suivi sur 3 plants par UE.

On limite les effets de bordure en ne prenant que les plants situés sur le billon central. Lors de la récolte, le poids des aubergines récoltées est noté pour chaque unité expérimentale.

Après transplantation des aubergines, le suivi du développement du flétrissement bactérien sera enregistré selon l'échelle 0-1 :

- 0 = sans symptôme ;
- 1 = plant au ¾ flétri ou mort de flétrissement bactérien.

Le protocole complet est disponible en annexe 6.

### 2.1.6. Les calculs et analyses des données

Le nombre de plants flétris à la date  $t_k$  nous permet d'évaluer l'**incidence de la maladie** à ces mêmes dates et son évolution au cours du temps représentée par la courbe  $IFB=f(t_k)$  avec pour chaque date ( $t_k$ ) :

$$IFB(t_k) = \text{nb de plantes flétries à la date } t_k / \text{nb de plantes totales}$$

Avec  $IFB(t_k)$  : indice de flétrissement bactérien à X jours après inoculation (JAI),  $t_k$  : nombre de JAI lors de l'observation.

Les données des indices de flétrissement à différentes dates permettent d'évaluer la **sévérité de la maladie** à ces mêmes dates et son évolution au cours du temps représentés par la courbe  $AUDPC=f(t)$  avec pour chaque date  $t_k$  :

$$AUDPC(t_k) = \sum_{i=1}^{k-1} (IFB_i + IFB_{i+1})(t_{i+1} - t_i)/2$$

Avec  $AUDPC(t_k)$  : area under disease progress curve à X jours après inoculation,  $IFB_i$  : IFB au précédent jour d'observation,  $IFB_{i+1}$  : IFB le jour de l'observation,  $t_{i+1}$  : nombre de JAI le jour de l'observation,  $t_i$  : nombre de JAI au précédent jour d'observation.

Afin de normaliser les données, les indices de flétrissement bactérien (IFB) et les indices de colonisation (ICB) exprimés en % sont transformés en arc sinus (racine(IFB)), les valeurs AUDPC sont transformées en racine (AUDPC) et une ANOVA binomiale sur les données d'incidence et de colonisation est réalisée.

Le test de Von Neumann est réalisé pour montrer l'homogénéité des échantillons de données de deux répétitions.

Le test de Fisher permet de tester l'égalité de deux variances.

## 2.2. RÉSULTATS

---

### 2.2.1. Étude de la diversité génétique de *R. solanacearum* issue de la collection de souches guyanaises

---

#### 2.2.1.1. Prélèvement des plants

##### ➤ Prospection de nouvelles zones géographiques

Les prélèvements faits chez les producteurs de solanacées dans l'Ouest guyanais, zone jusqu'alors non prospectée, sont peu nombreux.

En effet, malgré l'aide des organismes agricoles locaux, il n'a été prélevé des plants que chez 2 agriculteurs dans la zone de St Laurent du Maroni. L'une des raisons est la saison de prospection ; en pleine saison des pluies, peu d'agriculteurs cultivent des solanacées en plein champ, car il y a trop de maladies sur les cultures. Seulement **5 plants** ont été prélevés dans cette zone (3 aubergines et 2 piments).

##### ➤ Prospection d'un nouveau précédent cultural

Les placettes de tomates mises en place sur des zones jamais cultivées donnent des résultats satisfaisants permettant de réaliser des prélèvements.

Au total, **84 plants** sont prélevés sur ces 4 parcelles. **Trois plants** d'aubergines ont aussi été prélevés chez un agriculteur (E1) avec un précédent « forêt ».

En résumé, 5 plants ont été prélevés chez les producteurs dans la zone non prospectée et 87 plants ont été prélevés sur un sol jamais cultivé. Les prélèvements se sont faits sur piments (2), aubergines (6) et tomates (84). (cf. liste des prélèvements annexes 7)

#### 2.2.1.2. Isolement des souches de Rs

Les isollements, réalisés au laboratoire du SALIM, ont permis de vérifier si les plants prélevés étaient bien atteints de flétrissement bactérien. Sur les 92 souches, **66** étaient des plants sur lesquels des colonies montrant des morphotypes typiques de *R. solanacearum* ont été isolées. Elles ont été conservées à température ambiante (cf. protocole de conservation des souches de *R. solanacearum*, annexe 8).

#### 2.2.1.3. Typage des souches de Rs

Le typage des souches est réalisé au sein de l'équipe de phytopathologie de Péninna Deberdt.

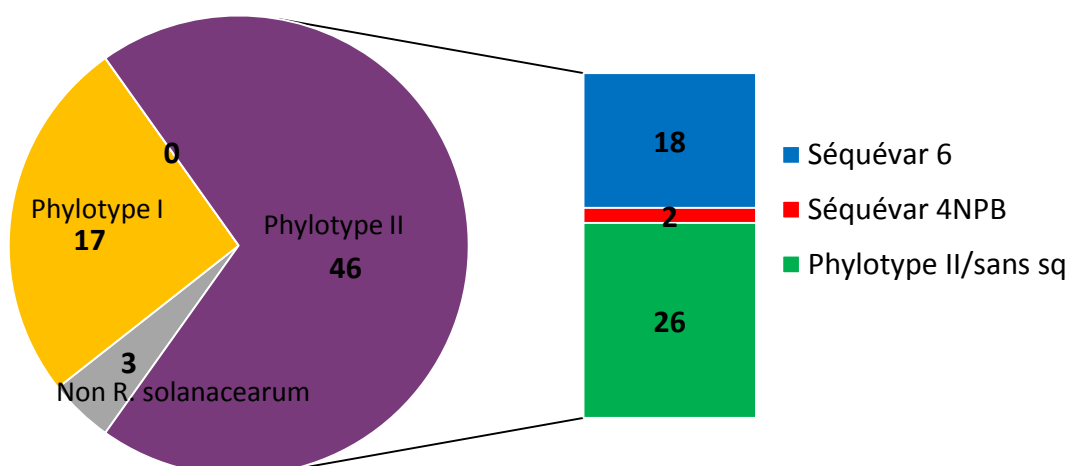
La PCR N-Phylotype est réalisée en premier afin de déterminer le phylotype des souches. Sur les 66 souches, 17 sont du phylotype I, 46 du phylotype II et 3 ne sont pas du *R. solanacearum*.

Ensuite, une PCR N-Musa est faite sur les souches de phylotype II afin de différencier les séquévars (cf. Figure 4). Seuls deux séquévars différents sont trouvés : le séquévar 6 (18 souches) et le séquévar 4 (2 souches). Les 26 autres souches sont seulement du phylotype II.

Une PCR Musa indique que les 2 souches séquévar 4 sont du séquévar 4NPB.

Une dernière PCR 630-631 est réalisée et nous indique que les 26 souches de phylotype II sans séquévar ne sont pas du séquévar 1.

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure ci-dessous.



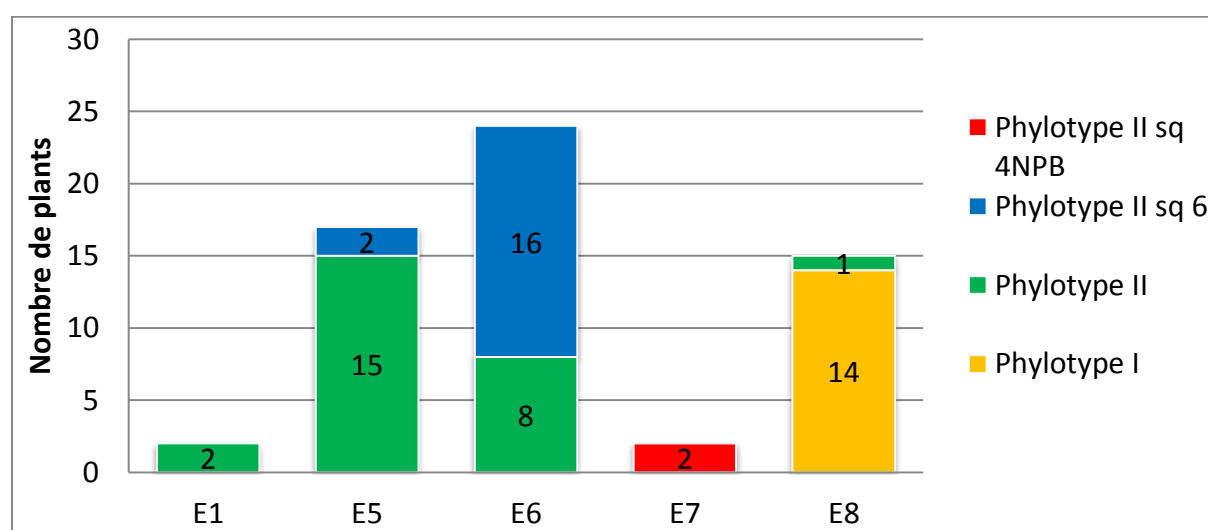
**Figure 7** : répartition des 66 souches de *R. solanacearum* prélevées en Guyane et typées au CIRAD-PRAM.

Sur les 5 plants prélevés dans la région de St Laurent du Maroni, zone non prospectée, seuls trois sont atteints de flétrissement bactérien et tous sont du phylotype I.

Les exploitations, issues d'un précédent forêt, possèdent, majoritairement, un unique phylotype de *R. solanacearum* : le phylotype II.

L'exploitation E8 est la seule à avoir des souches de phylotype I (14 sur les 15 souches analysées). Il est à noter que seule l'exploitation E7, présente du phylotype II séquévar 4NPB, la population émergente.

Cependant, E1 et E7 sont faiblement représentatifs, car seulement 2 souches de *R. solanacearum* ont été collectées dans chacune d'elle ce qui reste faible par rapport au nombre total de souches de *R. solanacearum* prélevées (figure 8).



**Figure 8** : répartition des différents phylotypes suivant les exploitations où le sol n'a jamais été cultivé.

### 2.2.2. Évaluation du pouvoir pathogène de 7 souches de *Ralstonia solanacearum* représentatives de la collection guyanaise

---

L'étude du pouvoir pathogène des 7 souches de *R. solanacearum* est menée pendant 28 jours, comme prévu, pour les cultivars de tomate. En revanche, l'apparition du flétrissement bactérien sur concombre a été plus tardive ; l'expérimentation a donc été rallongée pour les cucurbitacées (à 42 JAI). Il est donc décidé de réaliser les analyses statistiques séparément pour chaque espèce.

Pour l'analyse des résultats, nous avons choisi de regrouper les souches en 2 groupes : les populations historiques dont la présence est connue depuis les années 60 en Guyane (phylotype I et II) et la population émergente dont la découverte en Guyane est plus récente (phylotype II/4NPB).

L'IFB, permettant d'évaluer l'agressivité de la maladie et l'AUDPC, permettant d'évaluer la sévérité de la maladie, sont les deux indicateurs comparés.

Le résultat des isolements microbiologiques réalisés en cours d'expérimentation est disponible en annexe 9.

#### 2.2.2.1. Étude du pouvoir pathogène sur les cultivars de tomate

Le test de von Neumann est effectué pour différentes dates. Les données des deux répétitions sont homogènes, elles sont donc analysées ensemble ( $P=0,215$  pour IFB et  $P=0,257$  pour AUDPC).

##### ➤ Agressivité et virulence des souches sur tomates

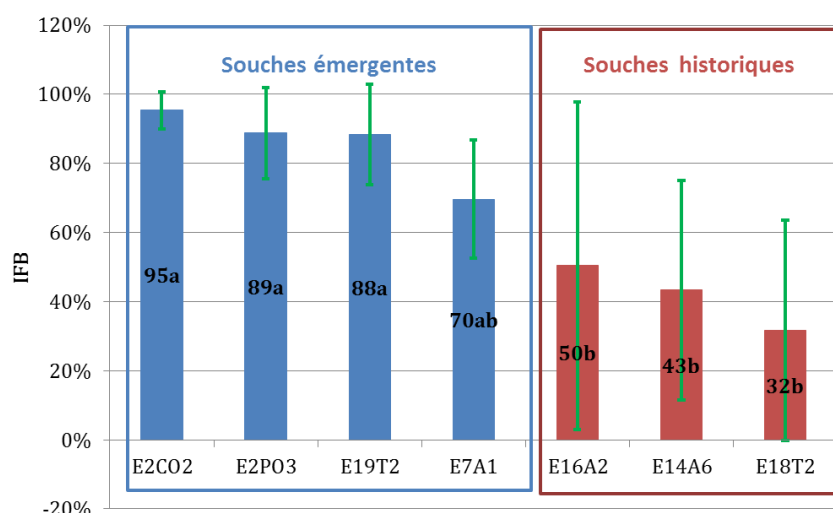
Les souches de phylotype II/séquévar 4NPB sont significativement plus agressives (IFB) et plus virulentes (AUDPC) que les souches de phylotype I et phylotype II/séquévar 1& 2 (Test de Fisher  $P=0,001$  pour AUDPC,  $p=0,000$  pour IFB).

En effet, les souches 4NPB ont les IFB les plus forts avec les écarts-types les plus faibles ; elles touchent donc tous les cultivars de tomates sans distinction.

Les souches historiques sont moins agressives. Elles touchent au maximum 50% des plants (souche E16A2), avec un écart-type de 0,65. Elles ont aussi tendance à avoir des écarts-types plus forts que les souches issues de la population émergente.

La souche E2CO2 est la plus virulente et présente un faible écart type. (Figure 9)

Le test de Fisher classe l'agressivité des souches en deux groupes ( $P=0,010$ ). Les souches émergentes E2CO2, E2PO3 et E19T2, les plus agressives, sont dans le groupe A et les souches historiques E16A2, E14A6 et E18T2, dans le groupe B. La souche émergente E7A1 peut, quant à elle, être classée dans les deux groupes.



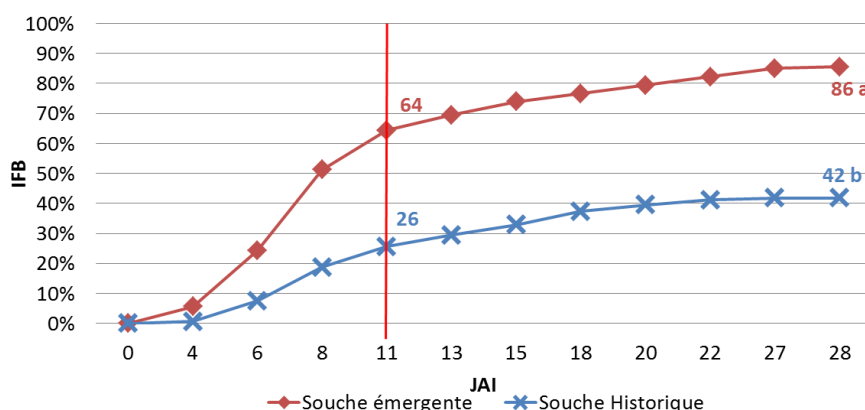
**Figure 9** : IFB moyen en fonction des souches inoculées sur les cultivars de tomates. Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

La figure 10 montre la cinétique de la progression du flétrissement bactérien et l'agressivité de la maladie chez les souches historiques et émergentes.

À 11 JAI, 64 % des plants inoculés par les souches émergentes sont atteints par le flétrissement bactérien alors que seulement 26 % des plants inoculés par des souches historiques sont flétris.

Les souches émergentes entraînent un taux de flétrissement supérieur à 70 % dès les deux premières semaines puis l'expression des symptômes ralentit. Pour les souches historiques, la contamination progresse plus régulièrement dans le temps.

À 28 JAI, 86 % des plants inoculés par les souches 4NPB sont morts de flétrissement bactérien alors que les souches historiques attaquent seulement 42% des plants de tomates.

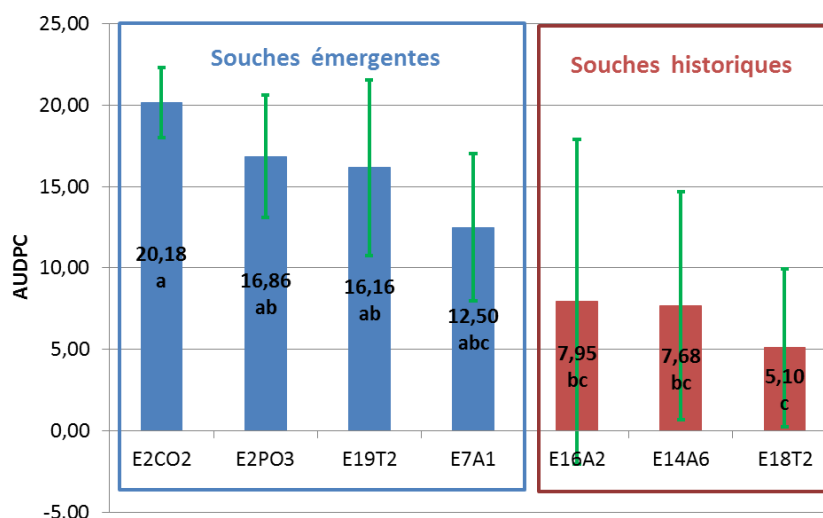


**Figure 10** : courbes de l'IFB pour les souches émergentes et pour les souches historiques après 28 JAI. Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes.\*

La sévérité des souches (AUDPC) montre que la souche E2CO2 est la plus virulente, c'est-à-dire qu'elle affecte très rapidement un grand nombre de plants.

La sévérité des souches est moins « tranchée » que l'agressivité. La souche E2CO2 est significativement plus virulente que les souches E14A6, E16A2 et E18T2 qui sont les souches représentatives de la population historique.

Il n'y a pas de différence significative entre une majorité de souches 4NPB (E2PO3, E19T2, E7A1) et deux souches historiques (E16A2, E14A6). (figure 11).

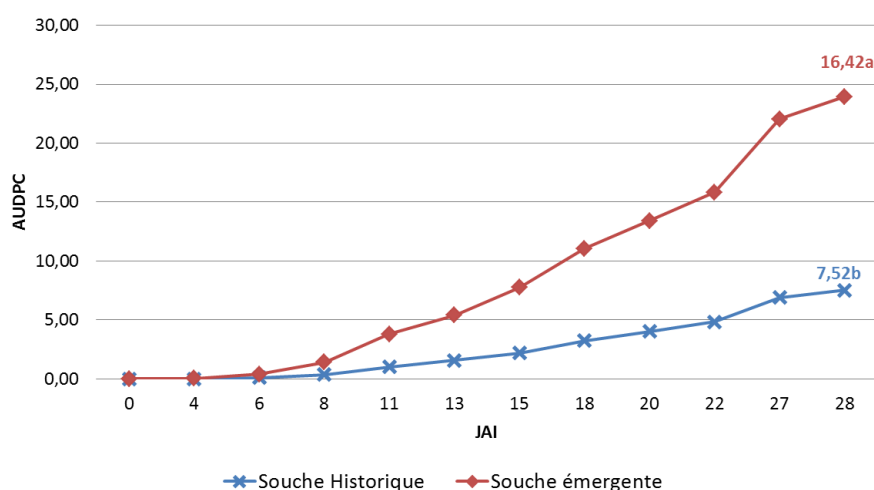


**Figure 11 :** AUDPC moyen en fonction des souches inoculées sur les cultivars de tomates à 28 JAI.

Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

La figure 12 montre qu'à partir du 6<sup>ème</sup> JAI; la sévérité de la maladie augmente significativement plus rapidement chez les souches émergentes que chez les souches historiques (test de Fisher,  $P < 0,0001$ ).

Les souches 4NPB affectent plus rapidement un grand nombre de plants par rapport aux autres souches.



**Figure 12 :** évolution l'AUDPC moyen des souches émergentes et des souches historiques sur les cultivars de tomates.

Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

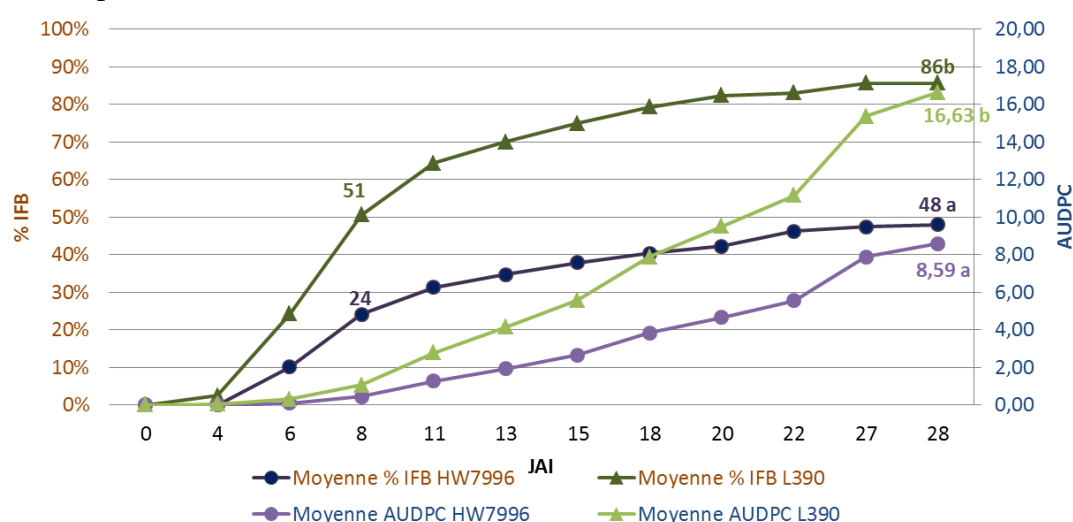
### ➤ Résistance et sensibilité des cultivars de tomates

Huit jours après inoculation, 51 % des plants de L390 ont flétri contre seulement 24 % des plants de HW7996. Pour le cultivar L390, jusqu'à 20 JAI, l'indice de flétrissement bactérien augmente fortement, et atteint 86 % à 28 JAI.

L'indice flétrissement bactérien chez le cultivar HW7996 augmente fortement les 11 premiers jours puis l'infection ralentie pour atteindre 48 % à 28 JAI (figure 13).

La sévérité des symptômes, sur les deux variétés, commence à se différencier à partir de 8 JAI ; à cette date, elle est plus forte sur L390 que sur HW7996. L'augmentation est quasi linéaire dans les deux cas avec une pente plus forte pour les L390 (figure 13).

Les souches inoculées sont significativement plus agressives sur le cultivar L390 (IFB=86%) que sur le cultivar HW7996 (48%) (test de Fisher  $p=0,092$ ). Il en est de même pour la sévérité de la maladie qui est significativement plus élevée chez les plants sensibles (AUDPC=16,63) que chez les plants résistants (AUDPC = 8,59).



**Figure 13 :** évolution de l'IFB moyen et de l'AUDPC moyen chez les cultivars de tomates L390 et HW7996.

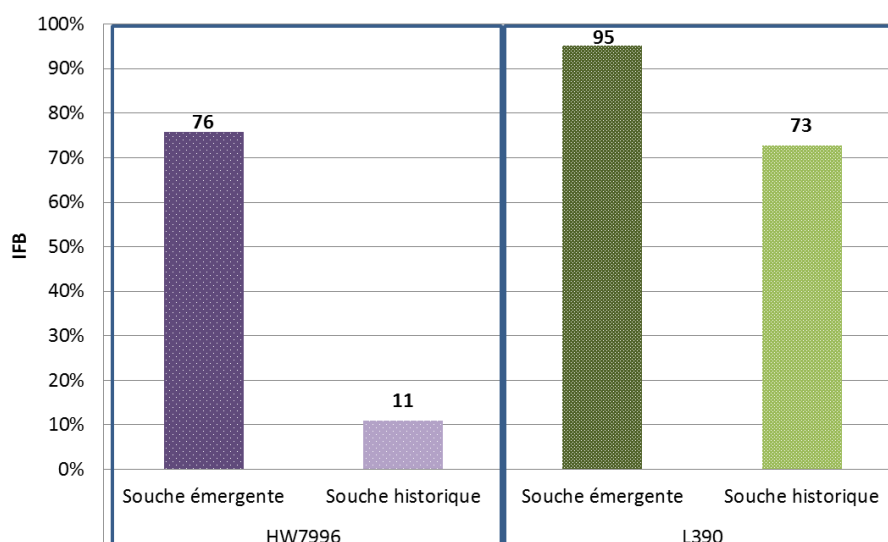
Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes

Cependant, suivant le type de souches inoculées (émergente ou historique), il existe de fortes variations au sein de chaque cultivar.

La figure 14 montre que, pour le cultivar HW7996, les souches émergentes (IFB = 70%) sont significativement plus agressives que les souches historiques (11%) (test de Fisher,  $P<0,001$ ).

Chez le cultivar L390, les souches émergentes montrent aussi une agressivité plus forte (test de Fisher,  $P=0,003$ ) que les souches historiques.





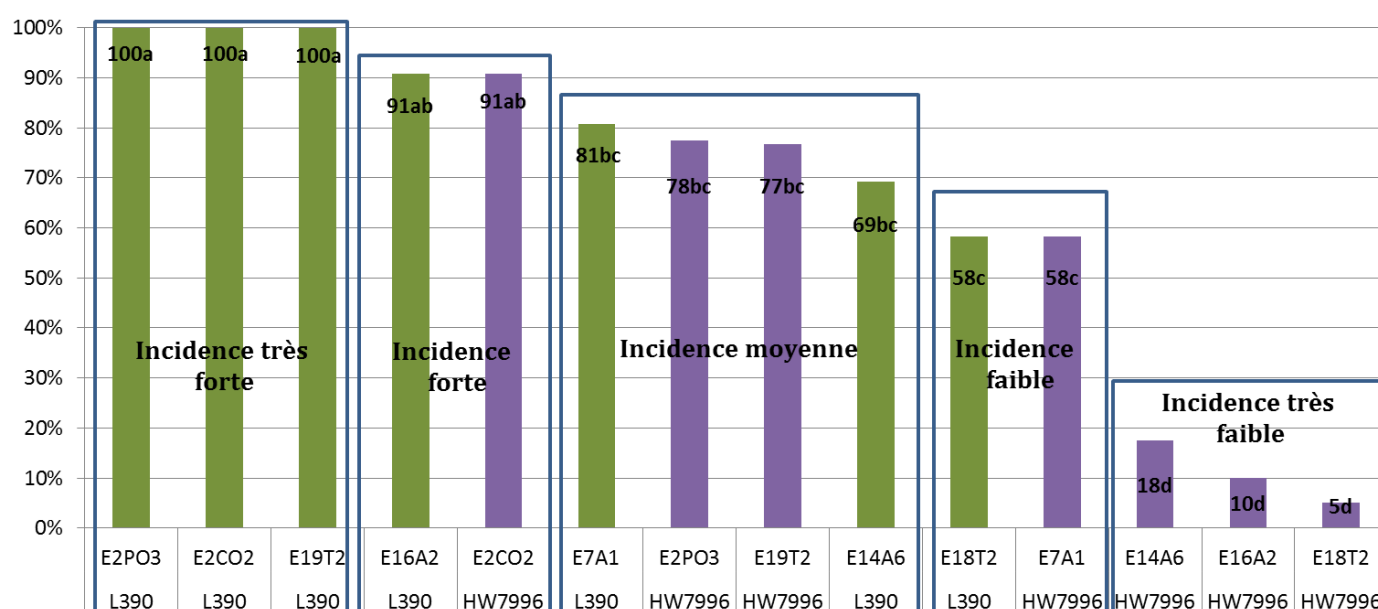
**Figure 14** : IFB chez les cultivars HW7996 et L390 en fonction des souches de *R. solanacearum* inoculées

➤ Comparaison des combinaisons « souches\* variété » et identification des combinaisons à risques

Le test de Fischer nous permet classer les combinaisons « variété\*souches » qui vont être plus ou moins « exposées » au flétrissement bactérien.

Cinq groupes sont obtenus à partir de ce test : incidence très forte, incidence forte, incidence moyenne, incidence faible et incidence très faible. La figure 15 regroupe les couples des différents groupes.

On remarque que les couples classés dans le groupe « incidence très forte » sont les couples « variété sensible\*souche émergente ». A contrario, dans le groupe « incidence très faible », on retrouve les couples « variété résistante\*souche historique ».



**Figure 15** : classification des combinaisons “variété\*souche” en fonction de l’incidence. Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test de Fisher,  $P < 0,0001$ ).

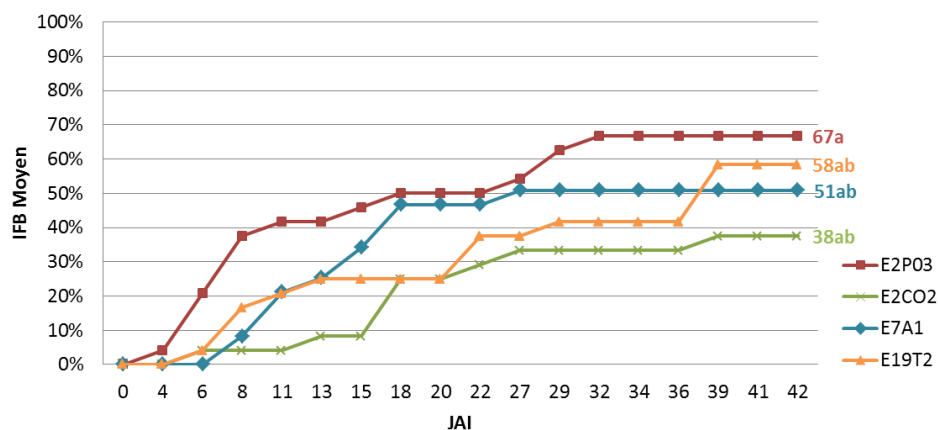
### 2.2.2.2. Étude du pouvoir pathogène sur concombres cv. EUREKA

Le test de von Neumann montre l'homogénéité des variances des deux échantillons de données ; les deux répétitions peuvent donc être analysées ensemble ( $P=0,360$ ).

Le test de Fisher montre une différence significative entre les souches émergentes et les souches historiques ( $p=0,000$ ). En effet, aucun concombre inoculé par une souche historique n'a flétri.

Les souches émergentes ont entraîné le flétrissement d'un nombre plus ou moins important des plants de concombre (figure 16). La souche E2PO3 est la plus agressive (67% de flétrissement bactérien moyen), mais n'est pas significativement différente des autres souches E19T2 (58%), E7A1 (51%) et E2CO2 (38%).

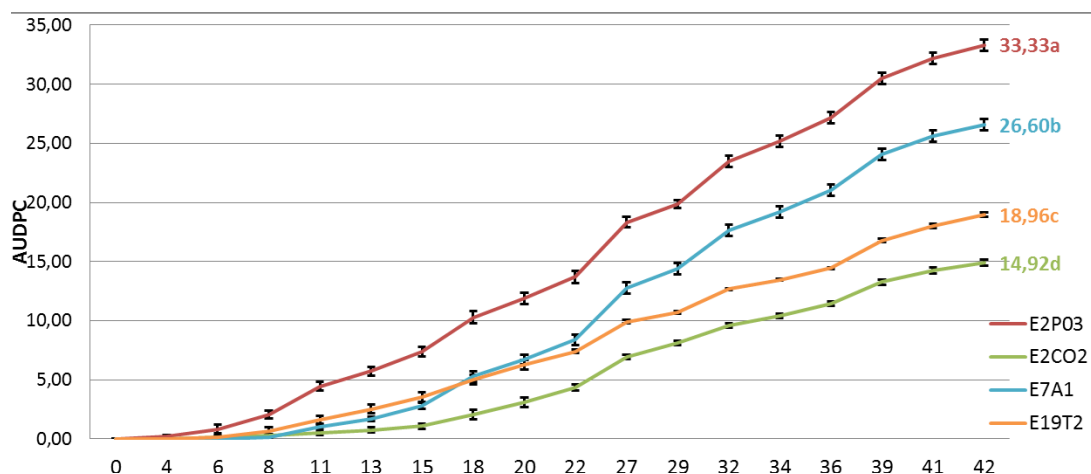
L'évolution de l'IFB au cours du temps permet de montrer que la souche E2PO3 contamine rapidement les plants de concombre (dès le 4<sup>ème</sup> JAI) ; il faut attendre le 6<sup>ème</sup> JAI pour les souches E2CO2 et E19T2 et le 8<sup>ème</sup> JAI pour E7A1 (figure 16).



**Figure 16** : évolution de l'IFB au cours du temps pour les souches inoculées sur le cultivar de concombre EUREKA.

Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes

L'analyse statistique de l'AUDPC permet de différencier les quatre souches émergentes. D'après le test de Fisher ( $p<0,0001$ ), les 4 souches émergentes expriment des sévérités significativement différentes. La souche E2PO3 est celle qui contamine le plus rapidement un grand nombre de plants (figure 17)



**Figure 17** : suivi de l'AUDPC moyen jusqu'à 42 JAI pour le cultivar de concombre EUREKA. Les valeurs ayant des lettres différentes sont significativement différentes

### 2.2.3. L'intégration des plantes de service en interculture afin de limiter les dégâts causés par le flétrissement bactérien en Guyane

#### 2.2.3.1. Souche de *R. solanacearum* présentes sur la parcelle

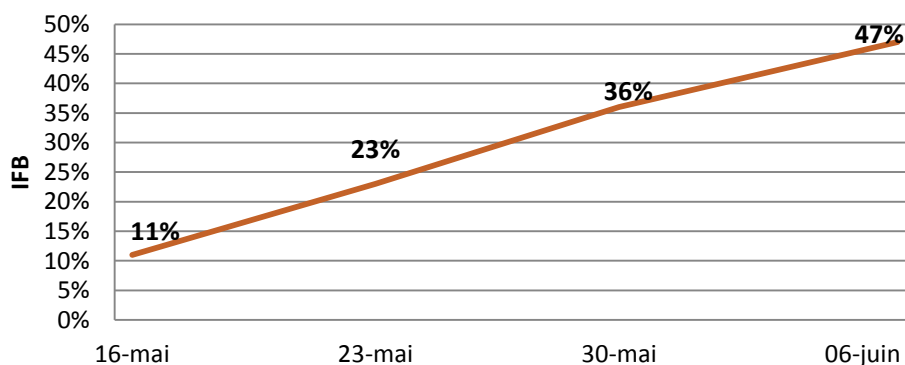
Lors de la phase 1, vingt plants de tomate sont prélevés afin de vérifier la présence de la bactérie *R. solanacearum* sur la parcelle. Après isolement, 4 plants ne sont pas atteints de flétrissement bactérien (20%), mais d'une autre maladie.

Sur les 16 plants flétris, huit sont phylotypés en Martinique. Ce phylotypage a mis en évidence la présence de phylotype I sur la parcelle expérimentale à 80 % (6 souches sur 8) ; 20 % ne sont pas du *R. solanacearum* (2 souches).

#### 2.2.3.2. Flétrissement bactérien sur tomate en phase 2

Un suivi du flétrissement bactérien sur les tomates de la modalité « Témoin sensible » est réalisé lors de la phase 2.

Le suivi est réalisé une fois par semaine durant 3 semaines.



**Figure 18** : évolution de l'IFB sur la modalité "témoin sensible" lors de la phase de l'expérimentation.

La figure 18 montre une augmentation quasi-linéaire du nombre de plants flétris au cours du temps. Après 3 semaines de mise en place des tomates, 47 % des plants ont flétri.

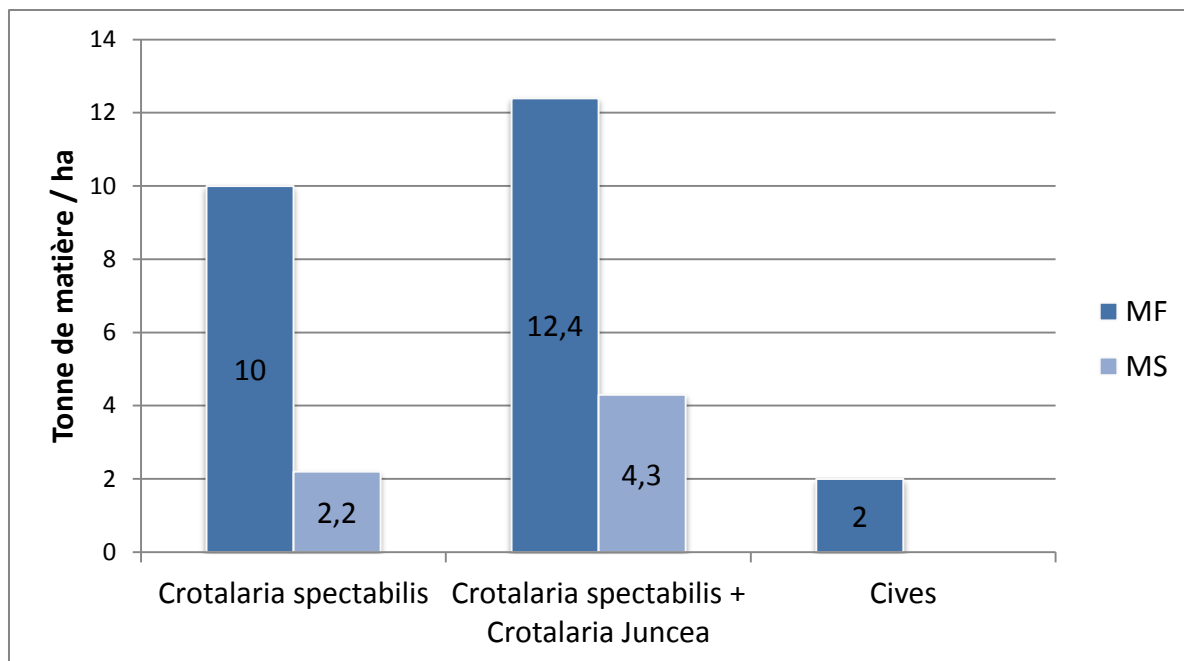
La courbe de progression de la maladie montre que l'épidémie n'a pas atteint de plateau 3 semaines après le début du suivi ce qui suggère que le développement des symptômes est toujours en progression au-delà du 06 juin.

#### 2.2.3.3. Incidence des plantes de service sur le flétrissement bactérien

Pour des raisons pratiques, les durées d'interculture et de mulch, préconisées dans le protocole n'ont pas pu être respectées : l'interculture a duré 60 jours (au lieu des 70 jours préconisé) et le mulch 15 jours au lieu des 35 jours conseillés. Un travail du sol non prévu est réalisé entre la phase 2 et la phase 3 afin de rehausser les billons et permettre un meilleur développement des aubergines.

##### ➤ Biomasse produite par les plantes de service

La biomasse produite par les plantes de service est assez faible. *C. spectabilis* a produit 1kg de matière fraîche (MF)/m<sup>2</sup> (0,220 kg de matière sèche (MS)), le mélange *C. spectabilis* et *C. juncea* 1,24 kg de MF/m<sup>2</sup> (0,43 kg de MS) et les cives seulement 0,20 kg de MF/m<sup>2</sup>.



**Figure 19** : matière fraîche (MF) et matière sèche (MS) produites par les trois plantes de service durant la phase d'interculture (en t/ha).

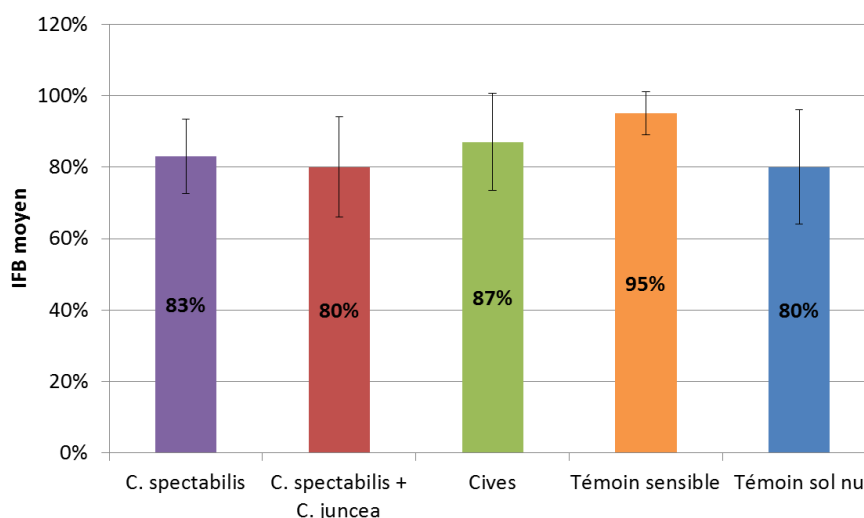
#### ➤ Incidence des plantes de service sur le flétrissement bactérien

Les aubergines sont plantées le 22 juin. La première observation est réalisée le 11 juillet.

69 jours après plantation, il n'y a pas de différence significative entre 5 modalités (Test de Fisher,  $p < 0,207$ ).

Cependant, le témoin sensible a l'indice de flétrissement bactérien le plus élevé (95 % de plants flétris).

A contrario, la modalité « *C. spectabilis* + *C. juncea* » et le témoin sol nu ont atteint 80 % de plants flétris : le taux de flétrissement le plus bas. Pour la modalité *C. spectabilis*, 83 % des plants sont atteints de flétrissement bactérien. Pour la modalité cives, 87 % de plants sont flétris.



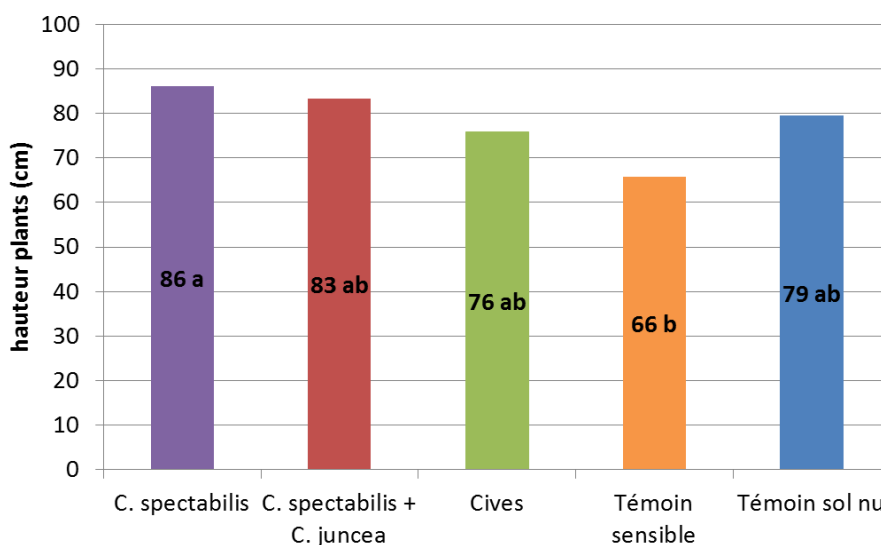
**Figure 20** : indice de flétrissement bactérien (IFB) à 69 jours après transplantation. Les valeurs avec des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test de Fisher,  $P < 0,755$ )

L'analyse statistique de l'AUDPC ne montre pas de différence significative entre les modalités.

➤ Incidence des plantes de service sur la croissance des plants d'aubergine

La hauteur de 3 plants suivis par UE est mesurée à partir d'un mois après plantation. À 55 jours, il y a une différence significative entre les 5 modalités.

La modalité *C. spectabilis* produit des plants significativement plus grands (86 cm) que le témoin « tomate » (66 cm). Cependant, la hauteur des plants de ce traitement n'est pas significativement différente de celle des modalités *C. spectabilis* + *C. juncea* (83 cm), témoin sol nu (76 cm), et cives (75 cm) (test de Fisher,  $p < 0.185$ ).

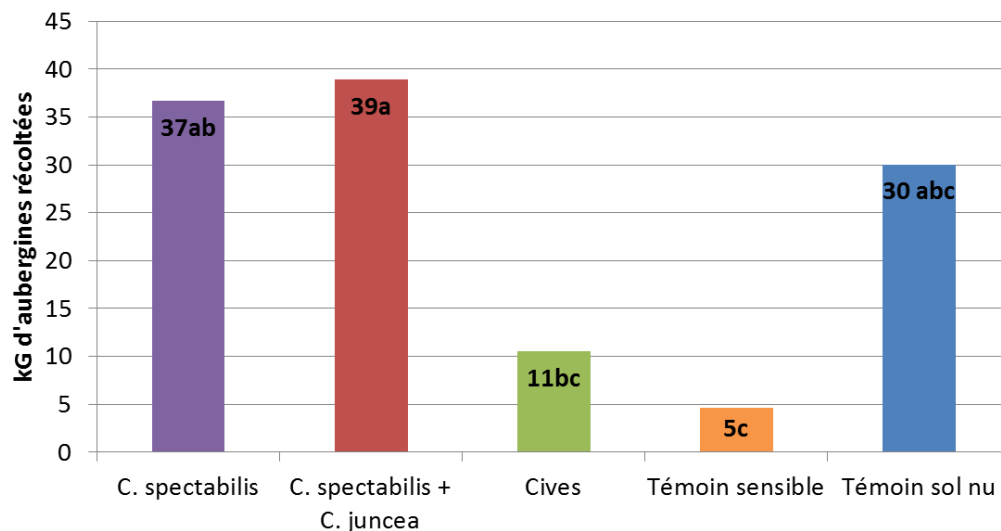


**Figure 21 :** hauteur moyenne des plants d'aubergine à l'issue de la phase 3.

Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test de Fisher,  $p < 0.185$ ).

La première récolte d'aubergine est réalisée le 8 août (soit 48 jours après transplantation). Une à deux récoltes sont réalisées hebdomadairement, par UE, en fonction de la production.

Dès 69 jours après transplantation, on voit des différences significatives de production entre les modalités (tableau 8). Les modalités *C. spectabilis* seul et *C. spectabilis* + *C. juncea* produisent significativement plus d'aubergines que la modalité témoin tomate.



**Figure 22** : production des 5 modalités 69 jours après transplantation (en kG).  
Les valeurs ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (test de Fisher  $p < 0,006$ ).

Les différents résultats obtenus suite aux expérimentations et prélèvements vont permettre de vérifier ou d'infirmer les hypothèses formulées au début de l'étude.



### 3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

#### 3.1. LA DIVERSITÉ DES POPULATIONS DE *R. SOLANACEARUM* EN GUYANE

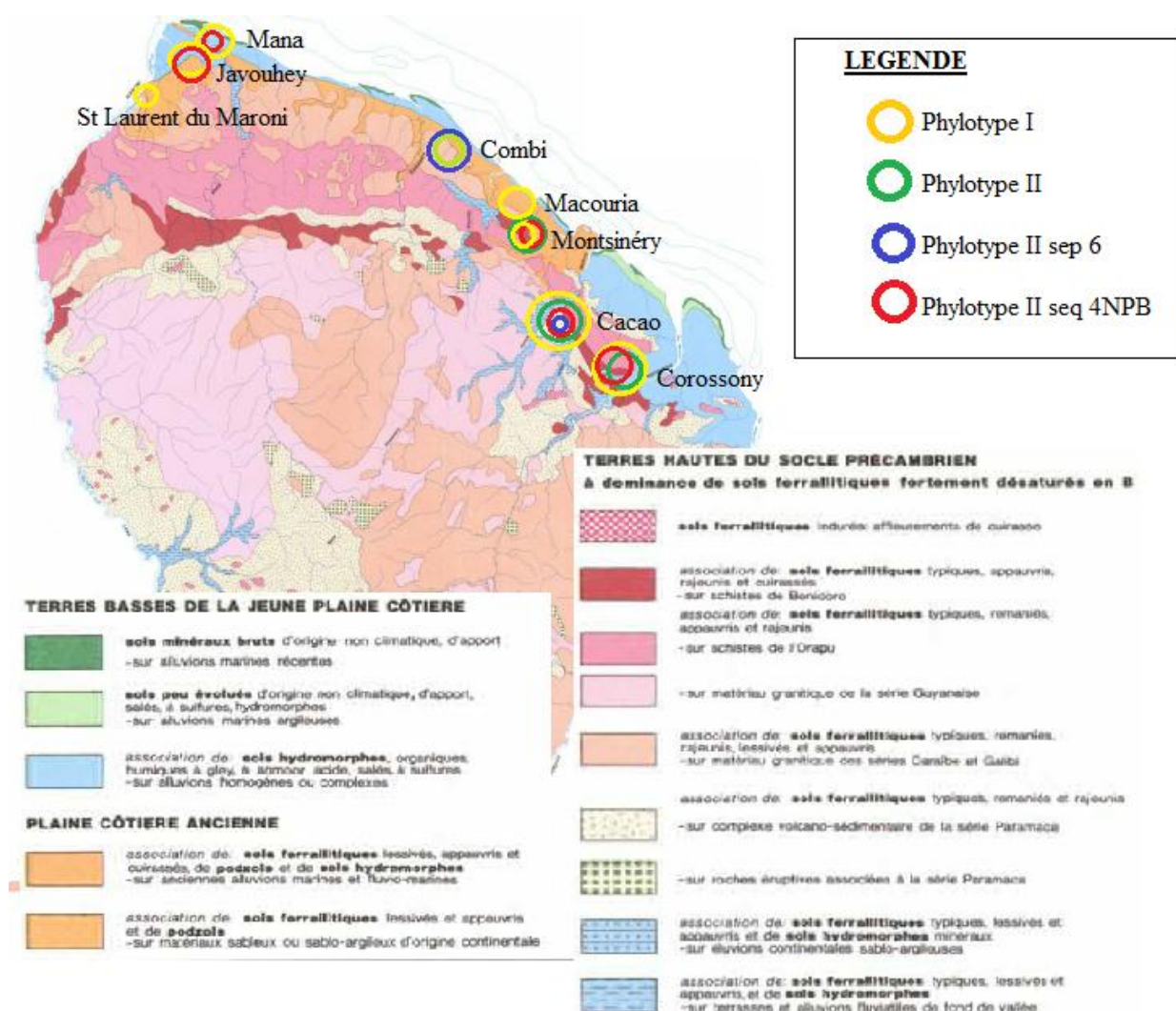
##### 3.1.1. Une nouvelle cartographie des souches de *R. solanacearum*

La collecte de nouvelles souches de *R. solanacearum* en 2012 permet de compléter la collection guyanaise débutée en 2011 par Noreskal.

Au total, **187 souches de *R. solanacearum*** ont été isolées et typées sur ces 2 années :

- une grande majorité appartient à la population historique (82%) ;
- 18% appartiennent à la population émergente II/4NPB

La répartition géographique des populations de *R. solanacearum* sur une carte pédologique ne permet pas de mettre en avant la prévalence d'un phylotype spécifique à un type de sol (figure 23). Les **8 zones prospectées** se situent soit dans un sol ferrallitique, soit dans une association de sol ferrallitique-sol hydromorphe, soit dans un sol hydromorphe. Les 4 phylotypes identifiés sont présents sur ces 3 types de sols.



**Figure 23 :** répartition géographique des populations de *R. solanacearum* en Guyane sur carte pédologique (source : ORSTOM).

### 3.1.2. La présence de *R. solanacearum* confirmée sur un précédent forêt

Les souches prélevées, sur « précédent forêt » appartiennent au phylotype I, phylotype IIA, phylotype IIA/sequovar6 et phylotype IIB/sequovar4NPB ; 97 % de ces souches appartiennent aux populations historiques de *R. solanacearum*.

Ces différents groupes phylogénétiques trouvés sur un même précédent sont le signe de la présence d'une **grande diversité génétique naturelle**. Pour juger de la diversité génomique, il serait nécessaire de séquencer les génomes complets de certaines souches (E. Wicker, communication personnelle).

La présence de l'agent *R. solanacearum* sur un sol qui n'a jamais été cultivé a été démontrée dans notre étude. On peut se demander quelle est **l'origine de ces souches**, historiques comme émergentes.

La classification de Hayward (1994) apporte un élément de réponse. Il rapporte les familles de plantes susceptibles d'être hôtes de *R. solanacearum* et les classe en 2 groupes : les **hôtes véritables**, groupe I et les autres, groupe II.

Le groupe I comprend :

- les espèces considérées comme des hôtes véritables ;
- espèces qui répondant à un ou plusieurs des trois critères suivants:
  - (1) sensibles à l'infection dans des conditions naturelles ;
  - (2) sensibles à l'infection dans des conditions naturelles et par inoculation ;
  - (3) très sensibles à l'infection par inoculation.

Le groupe II, quant à lui, regroupe les espèces qui ne sont pas considérées comme des hôtes véritables ou qui ne répondent pas aux trois critères précédents.

Trente-cinq familles sont représentées dans le groupe I. Les familles d'**Araceae**, d'**Heliconiaceae** et de **Zingiberaceae** en font partie (Hayward, 1994). Elles sont classées parmi une vingtaine d'autres familles, qui pour la plupart répondent aux exigences d'admission dans le groupe I.

Ces 3 familles de plantes sont présentes dans les forêts guyanaises.

L'hypothèse suivante peut donc être formulée : les familles d'Araceae, d'Heliconiaceae et de Zingiberaceae présentes en forêt guyanaise sont des **plantes hôtes-réservoirs** de *R. solanacearum*. Comme cet agent pathogène a la capacité de se maintenir sur un très grand nombre de plantes adventices (Hayward, 1994), il peut donc survivre sur sol nu quelques mois puis envahir des rhizosphères (ou même les racines) d'adventices et se maintenir ainsi plusieurs années.

Cela expliquerait que les tomates transplantées sur un précédent forêt aient exprimé les symptômes de flétrissement bactérien.

À l'échelle de la Martinique, les chercheurs ont trouvé 18 espèces hôtes de *R. solanacearum* dans 14 familles botaniques (Wicker, 2009). Des prélèvements similaires sur plantes sauvages et sur adventices pourraient être conduits en Guyane afin de référencer les plantes hôtes réservoirs de la bactérie.

### 3.1.3. Découverte d'une nouvelle souche de *R. solanacearum* en Guyane ?

Pour la première fois des souches de **phylotype II séquévar 6** ont été isolées en Guyane. D'après Wicker (communication personnelle), le séquévar 6 rassemble des souches Moko (souches affectant les bananiers). Mais contrairement aux autres souches Moko qui appartiennent au phylotype IIB, les séquévars 6 sont répertoriés dans le phylotype IIA.

Cette souche est donc en mesure d'infecter aussi bien les Solanacées que les bananiers.

Cependant, en 2007, l'UMR PVBMT de la Réunion avait diagnostiqué le séquévar 6 en Guadeloupe. Après séquençage, il s'est avéré être du phylotype IIA séquévar 36, normalement trouvé sur solanacées et pathogène sur solanacées uniquement.

On ne peut pas exclure que les souches guyanaises soient dans le même cas. Il faudrait compléter nos résultats de typages par des séquençages des gènes « Egl » et « mutS » (cf. 1.2.1) afin de confirmer la présence du phylotype IIA séquévar 6 en Guyane (Wicker, communication personnelle).

Si ce résultat est confirmé, ceci implique qu'il existe des souches Moko vivant à l'état "naturel" en forêt. La présence de phylotype II séquévar 6 sur un précédent forêt impliquerait aussi d'éviter de planter des bananiers directement après une défriche.

### 3.1.4. Le phylotype II/4NPB : une souche qui inquiète

La présence de souches émergentes appartenant au phylotype II/4NPB en Guyane est confirmée. On la trouve généralement sur des parcelles qui ont déjà été cultivées ; mais notre étude révèle sa présence sur des sols encore non cultivés, après forêt (2 cas).

Bien que ce chiffre ne soit pas représentatif de l'ensemble des souches collectées, il est inquiétant de constater la présence de la population émergente directement après forêt.

En Martinique, la population émergente appartenant au phylotype II/4NPB a été isolée sur *Anthurium andreanum*, et sur *Heliconia caribea* (Wicker et al, 2007), plantes appartenant aux familles des Araceae et des Heliconiaceae.

Il se peut donc que d'autres espèces de la même famille soient en mesure d'être colonisées par les souches de la population émergente. Les Araceae et les Heliconiaceae sont présents en grand nombre dans la forêt guyanaise ; ces plantes peuvent donc être à l'origine de la présence de la souche émergente sur les plants prélevés.

**Un séquençage des gènes « Egl » et « mutS »** de ces souches est nécessaire afin de démontrer leur classement évolutif en comparaison avec les souches émergentes trouvées en Martinique, au Brésil et à Trinidad & Tobago.

### 3.1.5. La population émergente menace aussi les Cucurbitacées

L'évaluation du pouvoir pathogène des souches représentatives de la collection guyanaise, réalisée au PRAM, permet d'avoir un premier aperçu de la virulence de la population émergente (Phylotype II/4NPB) guyanaise.

Cet essai a mis en évidence la forte virulence et agressivité des souches émergentes guyanaises. Elles sont responsables du développement fulgurant du flétrissement bactérien sur la variété de tomate sensible, L390.

Elles entraînent aussi le flétrissement bactérien sur la variété de tomate Hawaii 7996, connue pour son niveau élevé de résistance sur le plan international.

Aussi, nos résultats ont confirmé que seules les souches émergentes de *R. solanacearum* sont capables de déclencher le flétrissement bactérien sur concombre. Ces souches émergentes sont en effet connues pour avoir élargi le spectre d'hôtes de *R. solanacearum* aux cucurbitacées.

Une étude similaire a été menée en 2007 par Wicker et son équipe avec des souches martiniquaises. Le protocole expérimental étant proche, les résultats obtenus sont pris en compte dans notre discussion pour la compréhension de nos résultats (Wicker *et al*, 2007).

Les souches guyanaises du phylotype II/4NPB testées dans notre étude sont significativement plus agressives que les souches des autres phylotypes (II et I) et induisent un taux de flétrissement de 50 à 60% sur la variété de référence résistante, Hawaii 7996.

Il existe donc une similitude entre les souches émergentes de Guyane et celles de Martinique.

Cependant, les souches II/4NPB guyanaises apparaissent plus agressives que les souches émergentes de Martinique ; elles entraînent un taux de flétrissement de 92% chez le cultivar résistant HW7996 (contre 60% maximum pour les souches martiniquaises).

Les souches guyanaises entraînent également un taux de flétrissement élevé chez le concombre (jusqu'à 67% de flétrissement bactérien).

Ces souches appartiennent au phylotype II/4NPB sont donc très inquiétantes, car elles élargissent leur spectre d'hôtes à de nouvelles familles et apparaissent plus agressives en comparaison aux souches historiques. Il est donc possible que ces souches constituent un nouveau défi pour les sélectionneurs qui développent des cultivars de tomates dans cette région.

L'étude de la diversité des populations de *R. solanacearum* en Guyane démontre que :

- seuls les phylotypes I et II sont présents en Guyane ;
- une grande diversité génétique est présente sur un même précédent cultural ;
- la population émergente est plus virulente et agressive que la population historique ;
- les souches émergentes affectent les cultivars de tomate sensible et résistant et les Cucurbitacées.

Du fait de l'absence de variétés résistantes vis-à-vis de cette population émergente de *R. solanacearum*, il est donc nécessaire de trouver des moyens de lutte alternative permettant, sinon d'éradiquer les populations de *R. solanacearum*, au moins de contenir leur niveau de population à des seuils faibles, dans les sols.

### 3.2. INTRODUCTION DE PLANTES DE SERVICE EN INTERCULTURE ET IMPACT SUR LE FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN

---

Une expérimentation similaire à celle menée a été réalisée en Martinique, en plein champ, sur la station expérimentale de Rivière Lézarde au cours de la saison 2011-2012. Les protocoles expérimentaux étaient sensiblement identiques, les résultats obtenus en Martinique sont pris en compte dans notre discussion pour la compréhension de nos résultats.

#### 3.2.1. Le choix des 3 plantes de services

---

Les trois plantes de services testées pour cette expérimentation ont été sélectionnées après 4 années de recherche au CIRAD-PRAM sur une base multicritères obtenue après évaluations de caractères agronomiques couplées à des évaluations des traits fonctionnels des plantes vis-à-vis de l'agent du flétrissement bactérien, *R. solanacearum*.

Ces plantes ont été choisies pour leur potentiel assainissant vis-à-vis du flétrissement bactérien démontré en conditions semi-contrôlées (sol naturel, expérimentations en serre) (communication personnelle, P. Deberdt).

#### 3.2.2. Les résultats obtenus en Guyane

---

L'expérimentation en plein champ nous a permis d'étudier l'impact des « plantes de services » en interculture à l'échelle de la parcelle, dans le contexte guyanais.

Dans notre étude, il résulte que :

- L'effet assainissant significatif des plantes de service, sur l'expression du flétrissement bactérien n'est pas démontré ;
- l'effet « engrais vert » de *C. spectabilis* est démontré statistiquement.
- un meilleur développement végétatif des plants d'aubergine après un précédent « *C. spectabilis* » par rapport au témoin sensible est montré ;
- la production d'aubergines est significativement plus élevée après une « Crotalaire » qu'après des cives ou des tomates.

Le témoin « sol nu » ne diffère pas significativement ni des plants de services ni du témoin tomate aussi bien pour l'effet assainissant que la croissance et la production.

#### 3.2.3. L'introduction de *C. spectabilis* en interculture

---

La production de biomasse aérienne par *C. spectabilis* était plus élevée dans notre expérimentation (2.2 T/ha contre 1.4 T/ha en Martinique).

*C. spectabilis* semble bien adaptée à la Guyane et son utilisation peut donc raisonnablement être envisagée. De plus, sa productivité peut être augmentée :

- en allongeant la durée de culture (minimum 70 jours) ;
- en choisissant une période de semis plus propice à la germination (fin de saison des pluies) ;
- en augmentant la durée du mulch (35 jours).



Malgré une biomasse de *C. spectabilis* supérieure en Guyane, l'effet assainissant n'a pas été significatif.

En Martinique, l'utilisation de *C. spectabilis* réduit de façon significative l'incidence de la maladie après 37 jours (24 % de plants flétris contre 84% avec un précédent tomate) (Mathurin, 2012).

En Guyane, l'indice de flétrissement bactérien, à 38 jours, est de 37 % pour le traitement *C. spectabilis* contre 65% pour le témoin tomate. À la fin du suivi, à 69 jours, le flétrissement après *C. spectabilis* atteint 80 % des plants (95 % pour le témoin sensible).

Le potentiel assainissant de *C. spectabilis* a prouvé son intérêt en Martinique. Il est donc intéressant de se demander pourquoi, en Guyane, cette modalité a été inefficace.

Deux hypothèses peuvent être avancées :

- une durée de mulch insuffisante (17 jours contre 35 jours en Martinique) ;
- un taux d'infestation de départ par *R. solanacearum* trop élevé pour que l'effet assainissant se manifeste (95 % de plants flétris sur témoin « précédent tomate » en Guyane contre 65 % en Martinique.

### 3.2.4. L'introduction du mélange d'espèces *C. spectabilis* / *C. juncea* en interculture

La production de biomasse par l'association *C. spectabilis* + *C. juncea* a été décevante par rapport aux résultats obtenus en Martinique (4,3 t MS/ha contre 5,4 t MS/ha en Martinique pour *C. juncea* seul) (Mathurin, 2012), mais ce mélange apporte tout de même une biomasse nettement supérieure à celle fournie par *C. spectabilis* seule .

Cette association a été retenue, car *C. spectabilis* est peu tolérant à une forte humidité du sol. Le but de mélanger ces deux espèces était de pallier à la non-germination possible de *C. spectabilis*, par celle de *C. juncea*, qui supporte mieux les sols humides. Malgré, un semis deux fois plus dense la production de biomasse est plus faible que celle de la modalité *C. juncea* seule en Martinique (Mathurin, 2012).

### 3.2.5. Une efficacité mitigée des Crotalaires

En Guyane comme en Martinique, *C. juncea* a un pouvoir assainissant inférieur à celui de *C. spectabilis* (tableau 5). Toutefois, cette différence n'est pas significative à 5 %.

L'effet sur la croissance et la production des plants d'aubergines de l'association *C. juncea* + *C. spectabilis* est équivalent à celui de *C. spectabilis* seul et donne un meilleur résultat qu'avec un précédent tomate.

Incidence de la maladie à 37 JAT			
	Précédent <i>C. spectabilis</i>	Précédent <i>C. juncea</i> (+ <i>C. spectabilis</i> en Guyane)	Précédent tomate
<b>Guyane</b>	37 %	41 %	65 %
<b>Martinique</b>	24 %	49 %	84 %

**Tableau 5 :** comparaison des taux de flétrissement bactérien à 37 jours en Guyane et en Martinique



Cette expérimentation nous amène à nous demander si la mise en place d'une modalité *C. spectabilis* + *C. juncea* est intéressante. En effet, bien que cette modalité permette une production de biomasse plus importante, cela n'a pas permis de la différencier de la modalité *C. spectabilis* seul, que ce soit au niveau de l'effet assainissant, de la croissance des plants ou de la production d'aubergine.

Il serait donc intéressant de faire une modalité *C. juncea* seul afin de voir comment réagit cette espèce dans le contexte guyanais.

### 3.2.6. Introduction des cives en interculture : des résultats peu concluant

La biomasse des cives était très faible en comparaison de la production obtenue en Martinique. (MF = 2 T/ha contre 6,5 T/ha en Martinique).

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette faible production de cives:

- un type de sol limono-sableux peu adapté à la culture des cives ;
- une saison de transplantation des cives trop humide ;
- une période d'interculture trop courte (62 jours en Guyane au lieu de 70 jours recommandés et pratiqués en Martinique).

Or, la cive donne des résultats encourageants en Martinique avec une réduction de 50 % de la maladie. De plus, des essais réalisés *in vitro* montrent que les extraits d'*Allium fistulosum* réduisent de manière significative les populations de *R. solanacearum* dans le sol, à des concentrations de 100 % et 50 % (1:1 [wt/vol]<sup>1</sup>) (Deberdt *et al*, 2012).

Un essai en chambre climatique sur tomate confirme le fait que les extraits de cette plante sont capables de réduire significativement l'incidence du flétrissement bactérien (IFB = 61 % pour le témoin, et IFB = 6 % pour une concentration de 100% et IFB = 14 % pour une concentration de 50%) (Deberdt *et al*, 2012).

Or, lors de notre essai son efficacité assainissante n'a pas été démontrée (87 % de plants flétris). La faible biomasse produite, qui offre un mulch insignifiant, en est la cause la plus probable. .

### 3.2.7. Comment expliquer ces résultats ?

Pourquoi l'effet assainissant des plantes de services n'a pas été significatif sur la réduction du flétrissement bactérien lors de notre expérimentation en plein champ en Guyane ?

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour répondre à cette question.

**Le sol** : l'essai a été réalisé sur un sol limono-sableux, peu drainant et asphyxiant. La levée des plantes a été ralentie du fait de la formation d'une croûte de battance à la suite à de fortes pluies juste après le semis. Il était difficile pour les graines de Crotalaires de sortir du sol. Un contre semis a été réalisé. Les problèmes observés à la levée peuvent expliquer les résultats de notre étude. De plus, lors de fortes pluies, l'eau n'est pas évacuée en profondeur (sol peu drainant) ce qui permet la formation de spots infectieux de *R. solanacearum* sur la parcelle expérimentale.

---

<sup>1</sup> 1:1 [wt/vol] : 1g d'extrait dilué dans 1 mL d'eau distillée correspond à la concentration de 100%

**Le niveau d'infestation du sol en population de *R. solanacearum*** : l'essai a été mis en place sur une parcelle fortement infestée par *R. solanacearum*, que l'on pourrait qualifier de conditions « extrêmes ». On peut donc se demander si seul l'effet assainissant des plantes de service serait suffisant pour réduire significativement un tel niveau d'inoculum.

**La saison de réalisation** : l'expérimentation a été mise en place lors de la saison des pluies, favorable à la multiplication de *R. solanacearum* dans le sol. D'autre part, la germination des plantes de service est réduite en conditions trop élevées d'humidité, ce qui peut expliquer une levée difficile, un recouvrement partiel du sol et un faible développement végétatif des plantes. Enfin, la culture d'aubergines est rarement pratiquée en plein champ, en saison des pluies, en Guyane (excepté sous serre), car l'humidité est trop élevée.

**Le dispositif expérimental** : On remarque un effet « ligne » sur notre dispositif en billons sur la parcelle expérimentale. Sur certain billon il ne reste plus aucun plant d'aubergines quel que soit le traitement. La parcelle étant en légère pente, on peut supposer que les populations de *R. solanacearum* se soient propagées dans le billon le long des lignes, lors des fortes pluies. Cet effet « billon » peut avoir masqué l'effet des traitements.

Cette expérimentation devra être reconduite en conditions épidémiques moins « extrêmes » (incidence de maladie proche de 60 %), et en conditions des systèmes culturels pratiqués en pleine terre, sous serre, par les agriculteurs guyanais.

### **3.3. FAISABILITE D'IMPLANTER DES PLANTES DE SERVICES EN INTERCULTURE POUR LUTTER CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN EN GUYANE**

---

Outre le fait que l'effet assainissant des plantes de service n'est pas démontré dans notre expérimentation, une autre limite qui peut être mise en avant est le coût de mise en place de ce système pour un producteur.

#### **3.3.1. Des coûts importants de mise en place de l'interculture**

---

La mise en place de ce système de culture, dans des conditions réelles de production, nécessite un changement de pratique de la part de l'agriculteur qui cultive normalement toute l'année sur sa parcelle.

Ce système entraîne l'immobilisation de sa parcelle de production durant plus de 3 mois correspondant à la phase d'interculture : 70 jours minimum de plantes de service et 30 jours pour le mulch. Ces 3 mois représentent une perte nette, car les plantes de service ne sont pas valorisables économiquement.

Nous nous intéresserons seulement au coût de mise en place de l'interculture, indicateur qui permet déjà de mettre en avant les systèmes les plus coûteux. L'ensemble des coûts a été répertorié pour la mise en place des 5 modalités sur 150 m<sup>2</sup> (engrais, matière végétale, main d'œuvre).

Le tableau 6 présente les coûts qu'entraîne la mise en place des différentes modalités à 69 jours après transplantation. Le détail complet des coûts en euros est présenté en annexe 10.

DEPENSES		Coût/modalité				
		C. spectabilis	C. spectabilis + C. juncea	Cives	Témoins sensible	Témoin sol nu
Matériel Végétal	Aubergines	188	183	173	193	183
	C. juncea	0	7	0	0	0
	C. spectabilis	3	3	0	0	0
	Cives	0	0	<b>1050</b>	0	0
	Tomates	0	0	0	150	0
Consommable	Gazoil	10	10	7	7	7
Apports	0-20-23	21	21	24	23	17
	31-0-0	4	4	5	5	4
	Azofertil	0	0	0	0	0
	Calcaire Broyé	1	1	0	1	1
	P. Naturel	0	0	1	0	0
Traitement	Fusilade Max	1	1	1	1	1
	Karaté	0	0	0	0	0
Personnel	Salaire + charges sociales	202	260	<b>613</b>	228	195
<b>TOTAL</b>		429	489	<b>1874</b>	607	406

**Tableau 6 :** coûts de mise en place suivant les différentes modalités mises en interculture à l'échelle de la parcelle expérimentale.

### 3.3.2. Une interculture de cives très coûteuse

La modalité cives est la plus coûteuse à mettre en place avec des coûts s'élevant à 1 874€ pour 150 m<sup>2</sup>.

Ces principaux postes de dépenses sont :

- la **main d'œuvre** : nombreuse principalement dans les étapes de plantation et d'entretien (chaque plant de cives doit parer avant plantation ce qui prend du temps) ;
- **l'achat des cives** : 1050 € pour 150m<sup>2</sup> (7€ le kg en moyenne correspondant à 50 plants).

Il est à noter qu'en saisons des pluies, les cives peuvent être vendues jusqu'à 12€ le kg.

Le fort taux de flétrissement bactérien lié à cette modalité ne permet pas une forte production d'aubergines (87% de flétrissement). Cette modalité paraît donc peu intéressante pour un producteur.

### 3.3.3. Trois modalités intéressantes financièrement

Les modalités *C. spectabilis* seul, *C. spectabilis* + *C. juncea*, et sol nu semblent plus intéressantes.

Le témoin seul est logiquement le système le moins coûteux (406€ / 150 m<sup>2</sup>), car rien n'a été mis sur ces parcelles durant deux mois. Cependant dans le cadre de l'exploitation, ces parcelles ont dû être désherbées régulièrement pour ne pas permettre à *R. solanacearum* de se développer via des adventices hôtes ce qui explique le coût de main d'œuvre.

Les modalités *C. spectabilis* seul et *C. spectabilis* + *C. juncea* ont un coût de mise en place assez faible par rapport aux autres modalités (sauf témoin sol nu).

Ces modalités permettent une amélioration de la qualité du sol et des productions d'aubergines intéressantes après un mois de récolte (37 et 39 kG respectivement).

Cependant, le flétrissement bactérien est fort sur ces parcelles et il paraît difficile pour le producteur de produire plus de 150 kg d'aubergines (à 2€/kg) afin d'être rentable.

#### 3.3.4. Le système traditionnel coûteux

---

Le témoin sensible peut être assimilé au système traditionnel guyanais ; les producteurs cultivent toute l'année leur parcelle, ce qui est simulé par cette modalité.

Le témoin sensible est plus difficile à analyser, car deux cycles de culture se succèdent.

Les coûts de production sont élevés (607€/ 150m<sup>2</sup>).

Lors de la phase 2, aucune tomate n'a été récoltée, la plupart des plants étant morts. La mise en place d'une culture commerciale en plein champ, en interculture ne permet pas, dans notre cas, au producteur de réaliser des recettes.

De plus, au vu du flétrissement bactérien présent sur les parcelles d'aubergine, la production ne permettra pas au producteur d'avoir des recettes permettant de compenser les dépenses (seulement 5 kg d'aubergines récoltés après un mois).

Il n'est pas conseillé de faire des solanacées sur solanacées en Guyane.

#### 3.3.5. Des résultats à nuancer

---

Il est important de préciser que l'étude a été menée sur 5 unités expérimentales de 30 m<sup>2</sup> chacune par modalité. Le travail sur ces petites parcelles est donc plus compliqué et plus long (traitement réparti de manière aléatoire sur la parcelle expérimentale) ; cela entraîne donc des coûts de mise en place plus élevés que si le travail était réalisé sur une même parcelle de 150 m<sup>2</sup>.

De plus, c'est la première expérimentation de ce type en Guyane, la technique est loin d'être optimisée.

Les pertes de production liées à la période d'interculture n'ont pas été prises en compte.

Aussi, l'effet « bénéfique » de la phase d'interculture sur le sol, par l'apport de matière organique, n'est pas mesuré.

Cette étude reste indicative, mais elle permet d'avoir une idée approximative de l'intérêt du producteur à adopter ce type de pratique avec interculture.

Enfin, les recettes engendrées par la vente des aubergines et des cives n'ont pas été intégrées dans cette étude. L'une des raisons est que le cycle cultural des aubergines n'est pas terminé ; seul un mois de récolte a été suivi. Sachant que l'aubergine peut produire durant 4 à 5 mois, établir des recettes en s'appuyant sur un mois de récolte biaiserait les résultats. Aussi, les cives n'ont pas encore été récoltées et au vu de l'hétérogénéité de la production suivant les parcelles et les billons, il est difficile de calculer les recettes que leur vente pourrait engendrer.

Il est donc nécessaire d'optimiser le protocole expérimental dans le contexte guyanais afin de réduire les coûts de mise en place. Réaliser des expérimentations plus proches de la réalité des agriculteurs peut être une solution, en travaillant en saison sèche, sous serre et sur des plus petites parcelles expérimentales.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Le flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* est le frein majeur à la production de solanacées en Guyane. Il existe peu de méthodes de lutte efficace pour réduire cette maladie, en Guyane.

Il est donc nécessaire d'étudier une méthode de lutte innovante et agroécologique afin de limiter le développement des populations bactériennes de *R. solanacearum*. Avant d'aboutir à une proposition de lutte, il est indispensable de compléter les connaissances sur la diversité de l'agent pathogène en Guyane.

L'étude de la diversité génétique des souches de *R. solanacearum* guyanaises montre que seuls les phylotypes I et II sont présents. Aussi, elle met avant la présence de souche sur un sol qui n'a jamais été cultivé ; les souches prélevées, dans ce cas, montrent une grande diversité génétique. De plus, la présence de la population émergente, découverte en Martinique en 1998, est confirmée.

Suite à une expérimentation sur le pouvoir pathogène de souches guyanaises sélectionnées, la population émergente s'est montrée très agressive et virulente. Elle affecte aussi bien le cultivar de tomate sensible de référence, L390, que le cultivar de référence connu pour sa résistance, HW7996. Elle a également élargi son spectre d'hôtes, entraînant du flétrissement bactérien chez les Cucurbitacées. Ces souches II/4NPB semblent plus virulentes que les souches émergentes martiniquaises si l'on compare avec l'étude menée en Martinique par Wicker *et al.* (2007).

L'utilisation des plantes de services est en cours d'évaluation en Martinique avec des résultats préliminaires prometteurs. Leur effet assainissant sur le sol et sur la réduction des populations de *R. solanacearum* a été démontré dans un premier essai au champ (Mathurin, 2012). Un second essai est actuellement en cours afin de valider les premiers résultats.

L'expérimentation en plein champ en Guyane est assez similaire à celle de Martinique, cependant, elle n'a pas permis de démontrer, de façon significative, l'effet assainissant des plantes de service, *Crotalaria* spp. et *Allium fistulosum*. L'effet engrais vert des légumineuses est partiellement démontré. De plus, les coûts de mise en place des plantes de services sont très élevés.

Notre méthode de lutte n'est donc pas optimale et nécessite des améliorations. Au vu de ces premiers résultats, il est nécessaire de continuer les recherches afin d'optimiser l'intégration des plantes de services en interculture pour contrôler le flétrissement bactérien.

L'un des futurs axes de recherche concernera le criblage variétal des aubergines présentes sur le marché guyanais. Une expérimentation en milieu contrôlé permettra de sélectionner la variété d'aubergines la plus résistante au flétrissement bactérien, vis-à-vis de la diversité des souches guyanaises de *R. solanacearum*. Le deuxième axe concernera une expérimentation en conditions réelles, en pleine terre et sous serre, selon un dispositif proche de celui de notre expérimentation en plein champ, avec intégration de la variété d'aubergine sélectionnée dans le premier axe. Cette expérimentation sera conduite dans des conditions plus favorables aux plantes de services et plus proche de la réalité des agriculteurs.

Une lutte durable du flétrissement bactérien, ne peut être obtenue que par l'association de méthodes de lutte telles que : l'utilisation de variétés tolérantes, la solarisation (Noreskal, 2011), les plantes de service (dont il faudra déterminer l'utilisation optimale) et des méthodes prophylactiques.



## BIBLIOGRAPHIE

---

Agreste. 2011. Agreste données Guyane : recensement agricole 2010, premières tendances. Agreste Guyane. N°2. Pp. 1-4.

Anonyme. 2007. Lutte préventive contre le flétrissement bactérien en culture de tomates hors sol : états des connaissances et conseils. Armefflor, CIRAD, Pôle de protection des plantes. St Pierre (La Réunion). Pp. 1-143.

Arnault I., André I., Diwo-Allain S. Auger J. et F. Vey. 2005. Propriétés des Alliés : biodésinfection des sols maraîchers au moyen d'oignon et de poireau. La défense des végétaux. N° 578. Pp ?

Cardoso Susane C., Soares A.C.F., Brito A., Francisco F., Laranjeira C.A. et P. Ledo Andiale. 2006. Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and *Crotalaria* to soil. Summa phytopathology. Vol 32, n°1. Pp 234- 256.

Carmeille A., Caranta C., Dintinger J., Prior P., Luisetti J. et P. Besse. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3 – phylotype II resistance in tomato. Theory Application Genetic. Vol 113. Pp : 110-121.

Coupat-Goutaland B., Bernillon D., Guidot A., Prior P., Nesme X. et F. Bertolla. 2011. *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol. 24, N° 4. Pp 497-505

Deberdt P, Perrin B, Coranson-Beaudu R, Duyck PF et E. Wicker. 2012. Effect of *Allium fistulosum* Extract on *Ralstonia solanacearum* Populations and Tomato Bacterial Wilt. Plant Disease. Vol. 96. Pp.687-692

Deberdt P. 2010. Rapport de mission d'appui en phytopathologie sur la problématique du flétrissement bactérien sur Solanacées, en Guyane. Montpellier : CIRAD. 17 p.

Deberdt P, Queneherve P, Darasse A, et P. Prior. 1999. Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the Mi gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. Plant Pathology. Vol 48, n°3. Pp 408-414.

Digat B. 1967. Survey of bacterial wilt of solanaceous crops in French West Indies and in French Guyana. INRA : Petit Bourg (Guadeloupe). P 19.

Elphinstone. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pp. 9-28. In Allen C., Prior P. et A.C Hayward., (eds). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society. St. Paul (Etats-Unis). Pp 404-413.

Fegan M. et P. Prior. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex"? In Allen C., Prior P. et A.C Hayward., (eds). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society. St. Paul (Etats-Unis). Pp 404-413.

Fernandes P., Deberdt P., Chave M., Sire- Diedhiou, Minatchi S., Coranson Beaudu R. et E. Goze. 2012. Des plantes assainissantes candidates pour réduire le flétrissement bactérien de la tomate dans les conditions de la Martinique. Les Cahiers du PRAM. N° 11. Pp. 27-30

- Galan MB. Et AMBRE Développement. 2010. Étude préalable à la mise en place d'un dispositif de transfert en Guyane ; rapport final. INRA. Pp 15-23.
- Genin S. et C. Boucher. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. Annual revue pathology. Vol. 42. Pp. 107-134
- Germani G. et C. Plenchette. 2004. Potential of *Crotalaria* species as green manures crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi. Plant and soil. Pp 333-342.
- Gorissen A., Van Overbeek L. S. et J D. Van Elsas. 2004. Pig slurry reduces the survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in soil. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 50, n° 8. pp. 587-593.
- Graham A.F. et K. Hajime . 1966. Selective inhibition of reovirus induced RNA in L cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 24, n° 2. Pp 150-155
- Grey B.E. et T.R. Steck. 2001. The viable but nonculturable state of Rs may be involved in long-term survival and plant infection. Appl. Environ. Microbiol. Vol 67. Pp 3866-3872.
- Hayward A. C. 1991. Biology and epidemiology of **bacterial** wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Revue Phytopathology. Vol 29. Pp : 65-87.
- Janse J. H. et P. Van Puijenbroek. 1998. Effects of eutrophication in drainage ditches. Environmental Pollution. Vol. 102, n°1, Supplement 1. Pp. 547-552
- Kelman A. 1998. One hundred and one years of research on bacterial wilt. Pp. 1-5 In Prior P., Allen C., et J. Elphinstone. (eds). Bacterial Wilt Disease: molecular and Ecological aspects. Springer.
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*. n°44. Pp:693-695.
- Lebeau A. 2010. Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum* : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine. Thèse de doctorat : science : La Réunion : université de la Réunion. Pp 10-131
- Mathurin F. 2012. Étude du potentiel assainissant de plantes de services contre le flétrissement bactérien (*R. solanacearum*) en conditions de plein champ. Rapport de stage : Agronomie. Montpellier. SupAgro Montpellier. P. 1-61.
- Noreskal N. 2011. Typologie des pratiques agricoles sur Solanacées et diversité génétique de *R. solanacearum*, agent causal du flétrissement bactérien. Mémoire Ingénieur : Agronomie : Paris. Agroparistech. Pp 1-103.
- Okabe S. et K. Fukuda. 1971. Response of a gamma compensated ionization chamber to neutrons in intense transient gamma-fields. Nuclear Instruments and Methods. Vol. 96, n° 2. Pp 253-257
- Olsson K. 1976. Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* in Sweden. EPPO bulletin 6. Pp 199-207

- Poussier S. 2000. Exploration de la diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs d'inoculum. Thèse de doctorat : Biologie. Université de Rennes I. P 149.
- Poussier S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J. et A. Trigalet. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. Microbiology. Vol. 146, n°7. Pp : 1679-1692
- Prior P., Allen C. et J.G. Elphinstone. Eds. 1998. Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects. Springer-Verlag, Berlin (Allemagne). Pp 342-356.
- Prior P., Grimault V., Gélie B., Lemattre M. et J. Schmit. 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. Physiological and Molecular Plant Pathology. Vol. 44, n° 2. Pp. 105-123
- Regnault-Roger C., Philogène B.J.R. et C. Vincent. 2008. Biopesticides d'origine végétale. 2<sup>ème</sup> édition, Lavoisier Tech et Doc, Paris, France.
- Saddler G. 2005. Management of bacterial disease. In Allen C., Prior P. et A. C. Hayward (ed.). 2005. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* complex. American Phytopathological Society. St Paul (Etats-Unis). Pp 121-132.
- Schönfeld J., Gelsomino A., L.S. van Overbeek L.S., Gorissen A., Smalla K. et J.D. van Elsas. 2003. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 43, n°1. Pp : 63-74.
- Van Elsas J. et K. Smalla. 1997. Methods for sampling soil microbes. Pp. 383-390. In : Hurst C. J., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach C. H., M. V. Walter. (eds). Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Wang J.F., Hanson P. et J.A. Barnes. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. Pp 269-275. In Prior P., Allen C. et J. Elphinstone (eds). Bacterial wilt disease : molecular and ecological aspects. INRA Springer.
- Wang K.H., Mc Sorley R. et R.N. Gallaher. 2002. Effect of *Crotalaria juncea* amendment on nematode communities in soil with different agricultural histories. Journal of nematology. Pp 294-301.
- Wicker E., Grassart L., Coranson Beaudu R., Mian D. et P. Prior. 2009. Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of Rs in Martinique. Plant Pathology. Vol 58. Pp 853-861
- Wicker E., Grassart L., Coranson Beaudu R., Mian D., Guilbaud. C. Fegan M. et P. Prior. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Applied and environmental microbiology. Vol. 73, n° 21. Pp. 6790-6801.
- Wicker E., Grassart L., Coranson Beaudu R., Mian D., Guilbaud. C. Fegan M. et P. Prior. 2005. Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies) : a case study for epidemiology of bacterial wilt. In Momol MT, Ji P., Jones J.B. (eds). International symposium on tomato diseases. Acta Horticulturae. Vol 695. Pp. 145-152
- Yu J. R. 1999. Allelopathic suppression of *Pseudomonas solanacearum* of tomato in tomato chinese chive intercropping system. Journal chemical society. Pp. 69-723.

## TABLE DES ANNEXES

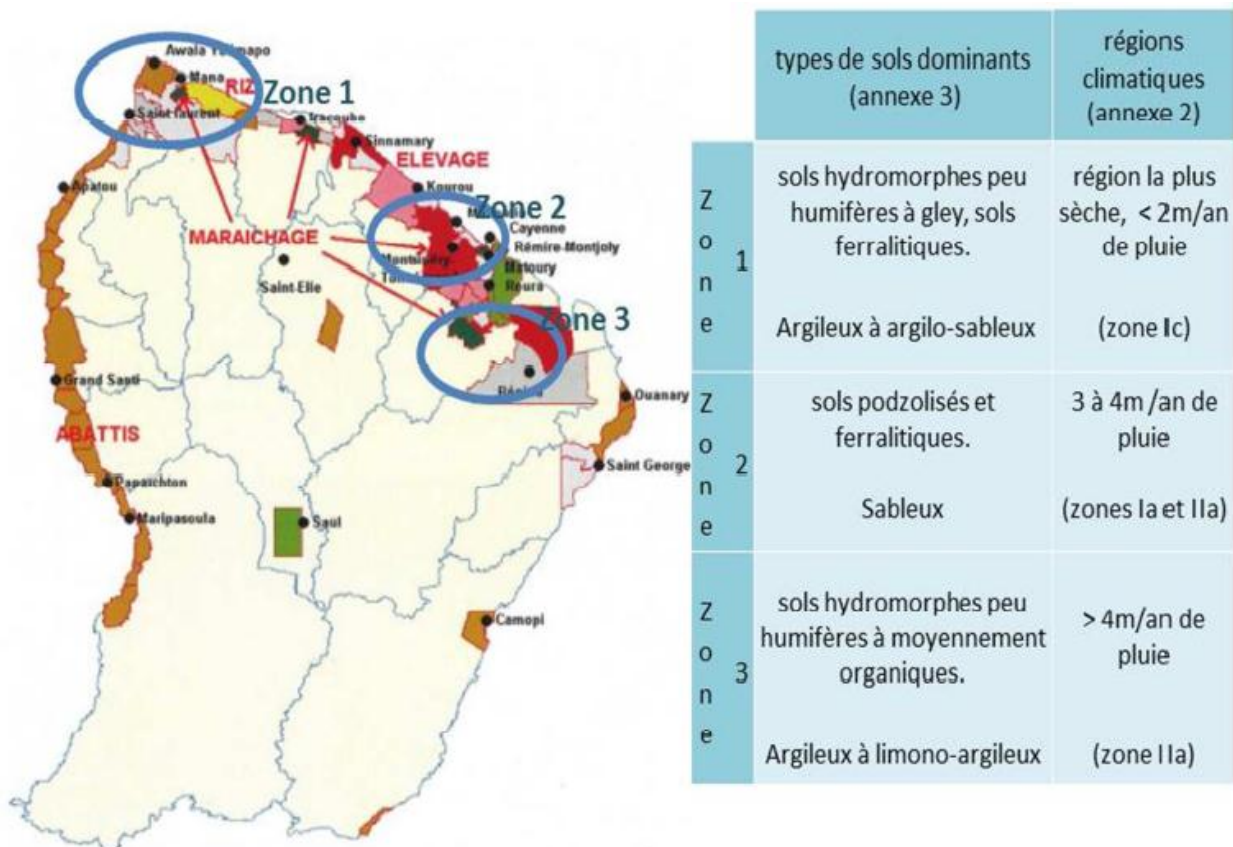
---

<b>Annexe 1</b> : Collection de souches représentatives des populations de <i>R. solanacearum</i> en Guyane.....	63
<b>Annexe 2</b> : Protocole d'isolement de <i>R. solanacearum</i> à partir d'un extrait de plante.....	65
<b>Annexe 3</b> : protocole du typage moléculaire .....	66
<b>Annexe 4</b> : Préparation d'un inoculum titré.....	69
<b>Annexe 5</b> : Protocole complet de l'expérimentation en chambre climatique .....	72
<b>Annexe 6</b> : Protocole complet de l'expérimentation en plein champ.....	75
<b>Annexe 7</b> : Liste complète des prélèvements réalisés chez les agriculteurs .....	81
<b>Annexe 8</b> : protocole de conservation des souches de <i>R. solanacearum</i> à température ambiante.....	83
<b>Annexe 9</b> : résultats des isollements en cours d'expérimentation en chambre climatique .....	84
<b>Annexe 10</b> : Tableau complet des coûts de mise en place de l'interculture .....	86
<b>Annexe 11</b> : milieu de culture pour <i>R. solanacearum</i> .....	87

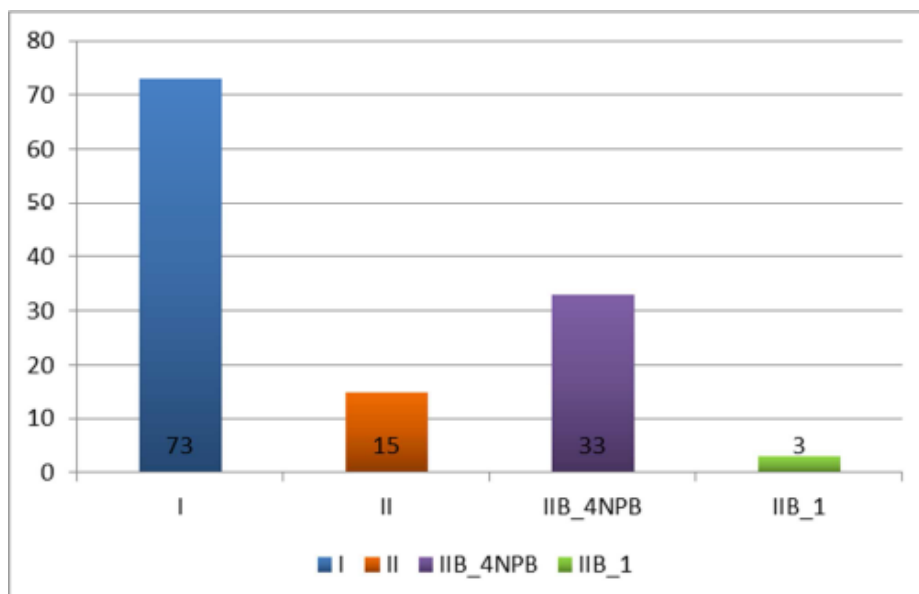
**Annexe 1 :** Collection de souches représentatives des populations de *R. solanacearum* en Guyane.

Les souches représentatives ont été choisies parmi les souches prélevées en 2011 par Noreskal.

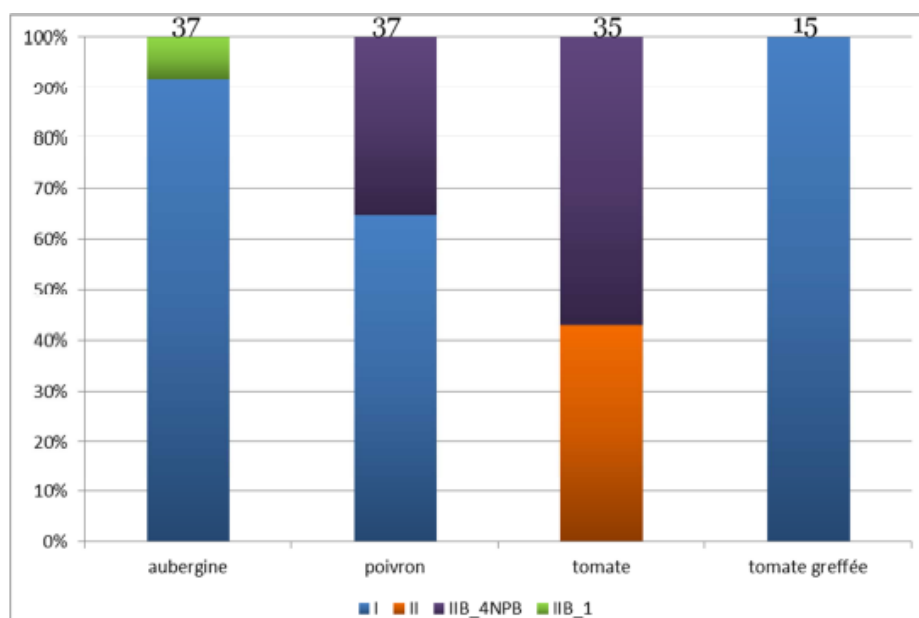
- **Zones géographiques :** ces 3 zones géographiques permettent de classer souches de *R. solanacearum* par secteur.



- **Phylotypes :** les phylotypes répertoriés sont les suivants :



Les différentes souches isolées et leur quantité (Noreskal, 2011)



Distribution des phylotypes en fonction de la plante hôte (Noreskal, 2011)



## **Annexe 2 :** Protocole d'isolement de *R. solanacearum* à partir d'un extrait de plante

Prélever les plantes entières, et les ramener au laboratoire.

Utiliser un outil désinfecté entre chaque échantillons (Ethanol 70% ou NaOCl 1.2%, ou flambé à l'alcool 95°).

Laver les racines et la tige au niveau du collet à l'eau courante + alcool 70°

Couper un fragment de tige d'environ 2 cm, près du collet, avec un sécateur ou scalpel désinfecté (Ethanol 70% ou NaOCl 1.2%, ou flambé à l'alcool 95°)

### **Sous hotte à flux laminaire, ou près d'une flamme :**

Tremper ce fragment dans l'Ethanol 95%, puis flamber

Transférer le fragment en boîte de Pétri 90, stérile

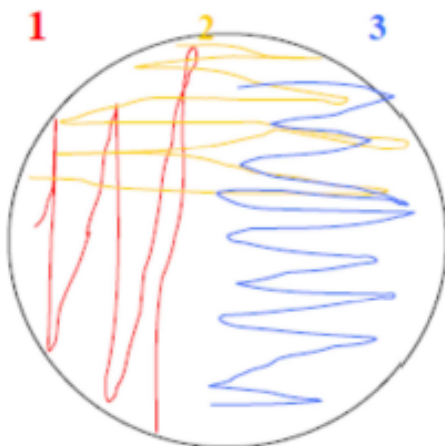
Ajouter environ 5 mL de Tris 0.01M pH7.2 sur les morceaux, et refermer la boîte

A l'aide d'un scalpel et pinces stériles, dilacérer le fragment de tige ; ou à l'aide d'un pilon de mortier stérile écraser le fragment (*R. Coranson-Beaudu, CIRAD*)

Laisser macérer 15 à 20 minutes, à température ambiante, sous la hotte

A l'aide d'une anse 10µL (plastique, à usage unique), prélever une goutte de macérât

Étaler sur milieu SMSA (milieu semi-sélectif), ou à défaut sur milieu Kelman K+ (non sélectif), sur 3 secteurs :



Incuber à 28°C, pendant 24h

Les colonies isolées (sur le secteur 3 de la boîte), caractéristiques de l'agent *R. solanacearum* (muqueuses, ovoïdes, blanches, au centre rosé rouge) sont alors prélevées pour repiquage de purification (cad: étaler sur milieu SMSA (milieu sélectif), ou à défaut sur milieu K+ (non sélectif), sur 3 secteurs.

Source : Protocole fourni par P. Deberdt du PRAM-CIRAD (Martinique)

### Annexe 3 : protocole du typage moléculaire

#### ❖ Préparation du master mix

Le mélange des réactifs se fait dans de la glace avec des consommables stériles.

Le tableau ci-dessous récapitule les quantités en  $\mu\text{L}$  des différents réactifs à mélanger pour le traitement d'une souche.

	PCR N-phylo type	PCR N-musa	PCR musa	PCR 630-631
eau ultra pure	11,55	11,55	7,35	13,05
dNTP 1,25 mM	4,00	4,00	4,00	4,00
tampon 10X	2,50	2,50	2,50	2,50
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,00	1,00	0,75	0,75
Mix d'amorces 10X	2,50	2,50	0,00	0,00
Amorce seule en solution	0,00	0,00	8x1 $\mu\text{L}$	2x1,25 $\mu\text{L}$
DMSO	1,25	1,25	0,00	0,00
Taq (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,20	0,20	0,40	0,20

Le mélange réactionnel contient les amorces qui permettront d'amplifier le segment d'ADN voulu. Les amorces peuvent être préparées de deux manières :

- En Mix, c'est à dire que toutes les amorces sont mélangées au préalable dans une solution à la concentration voulue puis le mix est rajouté dans le mélange réactionnel. (ligne 6 du tableau)

- Chaque amorce peut être mise en solution séparément à la concentration souhaitée. On rajoute alors les amorces une par une au mélange réactionnel. (ligne 7 du tableau)

Le tableau ci-dessous détaille les amorces utilisées pour chaque PCR.

	nom de l'amorce	identification	séquence
PCR N-phylogène	759-F	<i>R. solanacearum</i>	5'- gtc gcc gtc aac tca ctt tcc-3'
	760-R		5'- gtc gcc gtc agc aat gcg gaa tcg-3'
	Nmult:21:1F	phylogène I	5'- cgt tga tga ggc gcg caa ttt-3'
	Nmult :21 :2F	phylogène II	5'- aag tta tgg acg gtg gaa gtc- 3'
	Nmult :22 :InF	phylogène IV	5'- att gcc aag acg aga gaa gta-3'
	Nmult :23 :AF	phylogène III	5'- att acg aga gca atc gaa aga tt-3'
	Nmult: 22: RR	tous phylogènes	5'- tcg ctt gac cct ata acg agt a-3'
PCR N-Musa	IS24F :	séquévar 3	5'-tc ggg cgt gaa gag gca gac-3'
	IS24R :		5'-gga ggt gtg cgc atc aac ctg-3'
	MUS20F :	séquévar 4	5'-cgg gtg gct gag acg aat atc-3'
	MUS20R :		5'-gcc ttg tcc aga atc cga atg-3'
	Si28-F:	séquévar 6	5'- cgt tct cct tgt cag cga tgg-3'
	Si28-R:		5'- ccc gtg tca ccc cga tag c-3'
PCR Musa	VC46F :	séquévar 24	5'-ctc ctg gga gtc ggt tgg gtc-3'
	VC46R :		5'-agg gaa ctt agg cg tga ctg-3'
	Mus35-F:		5'- gca gta aag aaa ccc ggt gtt-3'
	Mus35-R:		5'- tct ggc gaa aga cgg gat gg-3'
	Mus20-F:	séquévar 4	5'- cgg gtg gct gag acg aat atc-3'
	Mus20-R:		5'- gcc ttg tcc aga atc cga atg-3'
PCR 630-631	Mus06-F:		5'- gct ggc att gct ccc gct cac-3'
	Mus06-R:		5'- tcg ctt ccg cca aga cgc-3'
	Si28-F:	séquévar 6	5'- cgt tct cct tgt cag cga tgg-3'
	Si28-R:		5'- ccc gtg tca ccc cga tag c-3'
	630-F	séquévar 1	5'- ata cag aat tcg acc ggc acg-3'
	631-R		5'- aat cac atg caa ttc gcc tac-3'

#### ❖ Préparation du mélange réactionnel

	Code ADN de référence	Identification
PCR N-phylogène	GMI1000	phylogène I
	ANT307	phylogène II
	CFBP3059	phylogène III
	MAFF301558	phylogène IV
PCR musa	UW162	séquévar 4
	UW11	séquévar 3
	UW21	séquévar 6
	05-152	séquévar 24
PCR musa	UW162	séquévar 4

PCR 630-631	UW11	séquévar 3
	ANT307	séquévar 4NPB
	UW21	séquévar 6
	05-152	séquévar 24
	05-160	
	05-163	

Préparer le volume adéquat de master mix pour traiter le nombre voulu de souches. (Prévoir une quantité supplémentaire de master mix pour le témoin et les ADN de référence).

Placer les microtubes sur un support à eppendorf puis les labelliser pour identifier les différentes souches, le témoin, les ADN de référence.

Verser 23µL du master mix dans chaque microtube.

Verser dans chaque microtube labellisé 2µL de suspension de la bactérie correspondante (conservée dans de l'eau distillée stérile), 2 µL de chaque ADN de référence (voir tableau ci-contre) et 2µL d'eau distillée stérile dans le microtube témoin.

### ❖ Réalisation de la PCR

Placer les microtubes bien fermés dans un thermocycleur.

Utiliser les programmes suivant pour les différentes PCR :

	température	durée	nombre de cycles		température	durée	nombre de cycles
PCR N-phylo type	96°C	5 min	1	PCR musa	96°C	5 min	1
	94°C	30 s	30		92°C	15 s	30
	59°C	90 s			59°C	15 s	
	72°C	90 s			72°C	30 s	
	72°C	20 min	1		72°C	10 min	1
	4°C	jusqu'au dépôt sur gel			4°C	jusqu'au dépôt sur gel	
PCR N-musa	96°C	5 min	1				
	94°C	15 s	30				
	59°C	30 s					
	72°C	30 s					
	72°C	10 min	1				
	4°C	jusqu'au dépôt sur gel					

### ❖ Migration sur gel

Préparer un gel d'agarose à 2%.

Le placer dans l'électrophorèse et le recouvrir de tampon TAE.

Verser dans chaque puits 5µL d'amplifiats (issu de la PCR) et 1µL de tampon de charge.

Rajouter dans l'un des puits 5µL de marqueur de poids moléculaire.

Faire migrer pendant environ 1h à 4V/cm.

### ❖ Révélation du gel

Révéler le gel par coloration en le faisant tremper dans 0,5µg/mL de bromure d'éthidium.

Sources :

Rédigé sur la base des protocoles fournis par R. Coranson-Beaudu du CIRAD-PRAM.

M. Fegan and P. Prior. 2005. How complex is the "Ralstonia species complex", edited by P. Prior, C. Allen and C. Hayward. Madison: APS Press

#### **Annexe 4** : Préparation d'un inoculum titré

Désignation	Rédaction	Vérification	Approbation
Nom :	R.CORANSON-BEAUDU	P. DEBERDT	C. CHABRIER
Fonction :	Technicienne	Chef d'équipe	Directeur Régional du Cirad

### **1. Objet et domaine d'application**

Ce document décrit les conditions de préparation d'inoculum titré d'une bactérie phytopathogène. Il s'adresse à toute l'équipe de Phytopathologie.

### **2. Principe de la méthode**

Il s'agit de repiquer des souches bactériennes pour multiplication et préparation d'un inoculum de titre connu. La purification des souches se fait sur un milieu semi- sélectif et la préparation de l'inoculum se fait à partir de souches préalablement multipliées sur milieu CPG.

### **3. Moyens employés**

#### **a. Le matériel (en spécifiant le matériel critique)**

Le matériel critique est identifié par « \* »

- Oses de 10 µL\*
- Flacon stérile de 40mL
- Tubes à hémolyse
- Pipettes\* et micropipettes\*
- Flacons et éprouvettes en verre stérile\*
- Spectrophotomètre\* et cuves à spectrophotomètre\*
- Étuve \*
- Vortex
- Parafilm, boîtes plastiques

#### **b. Les réactifs (en spécifiant les réactifs critiques)**

- Eau distillée stérile\*
- Tampon Tris pH 7.2
- Boîte de Pétri de CPG\*
- Botes d Pétri de SMSA

- Souche bactérienne de référence\*

#### **c. Consignes de sécurité spécifiques**

Les souches sont manipulées sous la hotte en salle 106 et éliminées en prenant toutes les précautions liées à l'utilisation d'une souche phytopathogène.

#### **d. Etalons et Calibrage**

Le zéro du spectrophotomètre se fait avec du tampon Tris ou de l'eau distillée stérile

### **4. Processus Opératoire**

#### **a. Étalement de purification**

La purification de la souche se fait au moins 3 jours avant l'inoculation.

La souche provient soit du congélateur à -80°C, soit d'une suspension bactérienne stockée au réfrigérateur, soit d'une culture sur milieu gélosé.

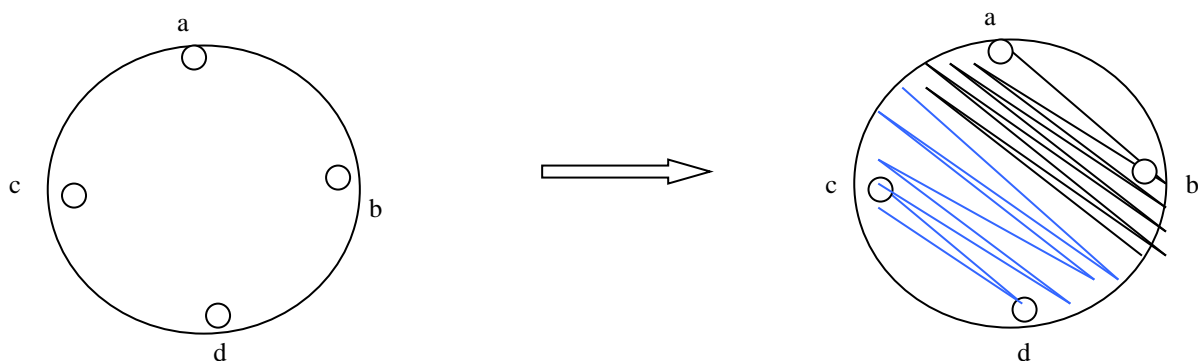
1 ose de 10µL est étalée sur milieu semi-sélectif (SMSA) en 3 secteurs afin d'obtenir sur le 3<sup>ème</sup> secteur des colonies bien isolées.

#### **b. Étalement de multiplication**

A partir d'une souche pure, prélever 1 grosse ose (10µl) de colonies et la déposer sur milieu CPG au coin (a) de la boîte. Renouveler l'opération 3 fois en déposant les colonies aux coins opposés (b, c et d).

Rejoindre les points (a) et (b) et étaler sur la moitié de la boîte. Répéter la même opération pour les points (c) et (d) sur l'autre moitié de la boîte

Incuber à l'étuve 1 à 2 jours à 28°C.



#### **c. Préparation de l'inoculum au laboratoire**

#### **✓ Grattage des boîtes d'inoculum (CPG, 1 jour de croissance à 28°C)**

- Injection de 5 ml de Tris ou d'eau distillée stérile dans une boîte
- Grattage avec une spatule stérile
- Transfert dans une 2<sup>ème</sup> boîte, et ajout de 5 mL de Tris ou d'eau distillée stérile
- Grattage de la 2<sup>ème</sup> boîte
- Récupération des 10 mL de suspension dans un flacon stérile de 40 mL



L'opération peut être renouvelée plusieurs fois en fonction du nombre de boîtes mères et de la quantité d'inoculum souhaitée.

✓ **Dilution de la suspension mère au 1/50<sup>ème</sup>**

Dans un tube à hémolyse mettre 4,9 mL de tampon Tris ou d'eau distillée stérile, puis ajouter 100 µL de suspension brute bien homogénéisée. Vortexer pour homogénéiser.

✓ **Dosage de la suspension au spectrophotomètre (salle 106 ou salle 206)**

La suspension est transférée dans une cuve à spectrophotomètre, que l'on bouche par un morceau de parafilm. Chaque cuve est ensuite posée dans une boîte en plastique fermée. On transfère alors la boîte de la salle 106 à la salle 206.

✓ **Mesure de l'absorbance**

La mesure de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 600nm.

L'étalonnage du zéro se fait avec du Tris ou de l'eau distillée stérile

La valeur d'absorbance ( DO) est notée

Après dosage, les cuves contaminées et leurs suspensions sont mises en sac autoclavable en salle 106 avant stérilisation.

✓ **Préparation des suspensions d'inoculation (salle 106)**

Calculer le nombre total de CFU dont on a besoin par récipient. Puis en déduire le volume de suspension mère à ajouter et le volume d'eau.

**1. Expression des résultats**

*a. Les critères de validation*

la  $DO \geq 1$ , les calculs de concentration ne sont pas valides. Il faut alors diluer de nouveau la suspension au 1/50<sup>e</sup> et refaire le dosage.

*b. les calculs*

- À 600nm une  $DO = 1$  correspond à environ  $10^9$  CFU/mL

Pour obtenir le titre de la suspension mère en CFU/mL, appliquer la formule :

$$\text{Titre} = DO * 10^9 * 50 \text{ (facteur de dilution).}$$

*c. la limite de détection*

Le spectrophotomètre mesure des absorbances entre 190 et 1100 nm. On ne peut pas doser une suspension avec une  $DO > 1$  (cf. « critères de validation »).

**2. Conditions de conservation et d'élimination des échantillons**

Pour la destruction du matériel contaminé et des inocula se référer à la procédure PRO-02/Phyt et au mode opératoire MO-03/Phyt.

**3. Commentaires – Remarques**

Ces suspensions sont utilisées lorsque l'on veut contaminer artificiellement un sol ou de l'eau, pour des essais de méthodologie d'extraction de microorganismes ou des tests de pathogénicité sur plante ou tout autre essai.



## **Annexe 5 :** Protocole complet de l'expérimentation en chambre climatique

### PROTOCOLE

Évaluation du pouvoir pathogène de 7 souches de *Ralstonia solanacearum* en provenance de Guyane sur Solanacées et cucurbitacées, en conditions contrôlées

#### ➤ **Objets**

- 3 variétés (tomate & concombre) : L390 (tomate), HW7996 (tomate), Eureka (concombre)
- 7 souches de *R. solanacearum* : 4 de Phyl II/4NPB, 1 de Phyl II /sequevar 1&2, 1 de Phyl II, 1 de Phyl I
- Un témoin eau est testé pour chaque variété.

Choix des souches : basé sur les résultats des typages Multiplex-PCR des souches guyanaises de la collection réalisée en 2011 (stage de M. Noreskal).

Phylotype/séquovar	Souche	Hôte d'origine	Commune
II/4NPB	E2PO3	Capsicum annuum	Cacao (zone 3)
II/4NPB	E7A1	Solanum melongena	Wayabo (zone 2)
II/seq1&2	E14A6	Solanum melongena	Corossoni 1 (zone 3)
I	E16A2	Solanum melongena	Javouhey (zone 1)
II/4NPB	E2CO2	Cucurbita pepo	Cacao (zone 3)
II	E18T2	Solanum lycopersicon	Montsinéry (zone 2)
II/4NPB	E19T2	Solanum lycopersicon	Corossoni 1 (zone 3)

#### ➤ **Dispositif**

Le dispositif sera un dispositif en blocs, à 1 répétition, avec 12 plants. 2 répétitions seront réalisées décalées dans le temps (2 dates différentes).

Les essais sont réalisés en chambre climatique au PRAM, Martinique : On dispose de 4 étagères. Sur chaque étagère sont disposés 6 plateaux, sur chaque plateau peuvent être disposés 12 pots de 7\*7\*6.5 cm.

Dans ce dispositif, on peut donc tester 24 plateaux, soit 288 plants (=pots 7\*7\*6.5).

#### ➤ **Chronogramme de la mise en place du dispositif**

Sortie des 7 souches de la collection et mise en culture en semaine 17.

Semis sur couche de terreau lundi 30 avril 2012 en pépinière : 250 graines/ variété (pour avoir 200 plantes). À noter, qu'il y a eu moins de 50% de germination chez les graines L390. Le nombre de plants présents ne nous permet pas de faire 2 répétitions simultanées

Transplantation des tomates, en pots, le 9 mai 2012 (semaine 19)

- 120 plants de L390
- 172 plants de HW7996

Semis des concombres le 10 mai 2012 (120 graines)

Au cours de la semaine : remplissage des pots avec terreau non stérile.

- Inoculation le 24 mai 2012 (Semaine 21)

- Mardi 15 mai : transfert des plants de tomates en chambre climatique
- Vendredi 18 mai : transfert des plants de concombres semés le 10/05 en CC
- Mercredi 23Mai : repiquage des 7 souches sur CPG
- Jeudi 24 mai : préparation d'un inoculum titré

➤ **Préparation des Inocula (cf. mode opératoire : Préparation d'un inoculum titré Annexe 7 )**

**Besoin en inoculum pour chaque souche:**  $1^{\circ}8 \times 5 \text{ mL} \times 12 \text{ plantes} \times 3 \text{ variétés} \times 1 \text{ rep} = 180 \text{ mL}$  d'inoculum (soit  $1,8 \times 10^{10}$  CFU).

**Par sécurité, prévoir 200 mL (soit  $2.0 \times 10^{10}$  CFU).**

- 8 flacons (ou 4 erlens) dont 1 flacon avec de H<sub>2</sub>O distillée stérile.
- Eau distillée stérile : 1,6 L

**Inoculation à  $1^{\circ}8/\text{mL}$**  (tomates au stade 3-4 feuilles/ concombre au stade 2-3 feuilles)

Scarification des racines, puis dépôt d'un volume de 5 mL d'inoculum en surface du sol, autour de chaque plant.

- Vendredi 25 mai : Arrosage plantes

➤ **Observations**

- Suivi du développement des symptômes :

L'enregistrement des symptômes est réalisé 3 fois/semaine :

Les lundi, mercredi et vendredi, en début de journée de 0 à 29 JAI (Jours Après Inoculation) selon l'échelle Coupat-Goutaland et al.), en notation plante à plante :

1. une feuille flétrie ;
2. deux-trois feuilles flétries ;
3. au moins 75% des feuilles flétries, mais tige droite ;
4. tige pliée, plante morte.

Le calcul de l'incidence de flétrissement se fait sur les plantes à note 3 et 4.

Le nombre de plantes flétries à la date  $t_k$  nous permet d'évaluer l'**incidence de la maladie** à ces mêmes dates et son évolution au cours du temps représenté par la courbe  $\text{IFB} = f(t_k)$  avec pour chaque date ( $t_k$ ) :

$$\text{IFB} (t_k) = \text{nb de plantes flétries à la date } t_k / \text{nb de plantes totales}$$

Les données des indices de flétrissement à différentes dates nous permettent d'évaluer la **sévérité de la maladie** à ces mêmes dates et son évolution au cours du temps représenté par la courbe  $\text{AUDPC} = f(t)$  avec pour chaque date  $t_k$  :

$$\text{AUDPC} (t_k) = \sum_{i=1}^{k-1} (\text{IFB}_i + \text{IFB}_{i+1}) (t_{i+1} - t_i) / 2$$

➤ **Isolements microbiologiques :**

À 28 JAT, à la base des tiges, sur tous les plants sans symptôme, pour repérer les infections latentes.

➤ **Extraction de *R. solanacearum* sur base de tiges**

À l'aide d'un scalpel stérilisé, des sections de tiges de 2-3cm sont coupées à 1cm environ au-dessus du niveau du sol, puis plongées dans de l'alcool à 95° avant d'être enflammées. Les sections sont finement broyées dans 5ml de Tampon Tris (ou d'eau distillée) et laissées incubées 15-20 minutes. Le surnagent est ensuite étalé sur milieu SMSA modifié en boîte de pétri. Les boîtes sont alors mises à incuber pendant 3 jours à 28°C.

On en déduit un **indice de colonisation bactérienne (ICB)**

$\text{ICB} = (\text{nb de plants flétris à 30 JAI} + \text{nb de plants colonisés à 30 JAI}) / \text{nb total de plants.}$
---

➤ **Analyse statistique :**

Les indices de flétrissement bactérien (IFB) et les indices de colonisation (IC) exprimés en % seront transformés en arc sinus (racine(IFB)) afin de normaliser les données. Les valeurs AUDPC seront transformées en racine(AUDPC)

(Nous pouvons aussi utiliser l'ANOVA binomiale sur les données d'incidence et de colonisation (glm sous R, package lattice)

## **Annexe 6 :** Protocole complet de l'expérimentation en plein champ

### **1. Objectifs**

Évaluer l'impact d'un précédent cultural de plantes de service (3 espèces) sur le contrôle du flétrissement bactérien et sur le développement végétatif de la culture d'aubergines, dans un sol naturellement infesté par *Ralstonia solanacearum*.

### **2. Hypothèses de départ**

Les plantes de services vont réduire le potentiel infectieux du sol en *R. solanacearum* : l'incidence du flétrissement bactérien sera significativement réduite dans les parcelles cultivées avec les plantes de service en comparaison aux témoins sol nu et solanacée.

Les plantes de services agiront en tant qu'engrais verts : un meilleur développement végétatif sera observé sur les plants d'aubergine après plantes de service en comparaison aux témoins sol nu et solanacée.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **1. Sol**

La parcelle expérimentale se situe sur une parcelle de l'EPLEFPA de Macouria. Il s'agit d'une parcelle qui sort d'une jachère anciennement infestée par Rsol. Afin de multiplier et d'homogénéiser l'inoculum naturel dans le sol, une culture de tomates variété « CARAÏB, improved Bacterial wilt tolerant » (*Lycopersium esculentum*) a été réalisée durant le premier mois.

### **2. Agent bactérien**

Les populations des souches Rsol naturelles seront identifiées après isolement bactérien sur 20 plants de tomate atteints de flétrissement bactérien, prélevés sur la parcelle expérimentale. Ces souches seront caractérisées par multiplex PCR au PRAM de Martinique.

### **3. Espèces de plantes de services à tester**

Les plantes de service testées sont 3 espèces à cycle long (70 jours) :

- 2 Fabacées : *Crotalaria juncea* cv.IAC-1, *Crotalaria spectabilis*
- 1 Alliacee: *Allium fistulosum*

Les plantes sont semées en plein champ. Seule la cive est transplantée.

Trois traitements « plantes de service » seront choisis :

- i. Une seule espèce (*Crotalaria spectabilis*)
- ii. une espèce (*Allium schoenoprasum*)
- iii. un mélange d'espèces (*Crotalaria spectabilis* + *Crotalaria juncea* cv.IAC-1)

### **4. Les témoins**

La « Tomate » constitue le témoin sensible à Rsol. La variété Heatmaster a été choisie comme variété de référence commerciale agricole, sensible aux souches appartenant à la population

émergente de Rsol mais résistante aux nématodes à galles autres ravageurs de la tomate. **Ce témoin permettra d'évaluer le potentiel infectieux du sol soumis à la culture d'intérêt commercial (tomate).**

Les plants de tomate seront préparés à l'EPLFPA et seront transplantés au stade 3-4 feuilles, après élimination partielle du terreau de semis adhérent au système racinaire.

**Le « sol nu » constitue le témoin sans plante.** Ce sol sera désherbé régulièrement manuellement afin de ne pas avoir de couvert végétal comprenant une flore adventice susceptible d'être hôte de Rsol. Ce témoin permettra d'évaluer la survie de l'inoculum dans un sol sans plante.

## **5. Dispositif expérimental**

### **PHASE 1 : Mise en place de tomates sur la parcelle (réalisée le 6 mars 2012)**

**Durée :** environ 1 mois

**But :** homogénéiser la présence de la bactérie sur la parcelle

**Mode opératoire :**

- Faire 15 billons de 50 m de long
- Transplanter les tomates cv. CARAÏB avec un espacement de 50 cm environ
- Travail du sol des parcelles en fin de phase

**Observations :** une par semaine vérifier l'évolution de la maladie sur les plants de tomate et isolement en « W » (si possible) sur une vingtaine de plants atteints de flétrissement bactérien.

### **PHASE 2 : Mise en place des plantes de service**

**Durée :** 70 jours

**But :** mettre en place différents traitements plantes de service pour comparer leur effet assainissant sur le sol

**Dimension des unités expérimentales :** 10\*4,3m soit 43 m<sup>2</sup> dont 10\*1m\*3 billons =

**30m<sup>2</sup> de surface utile**

**Pré-requis :**

Sur la parcelle, il y a un gradient induit par la pente. La matière organique est plus présente en bas de pente. Les blocs expérimentaux seront donc perpendiculaires à ce gradient.

**Matériel :**

- Cives : 7 500 plants
- *Crotalaria juncea* : 7 500 graines
- *Crotalaria spectabilis* : 10 000 graines
- Tomates : 300 plants

**Modalités de semis**

- Les cives sont plantées par ligne de 10 plants sur la largeur du billon avec un espacement de 20 cm entre les lignes

- Le *Crotalaria spectabilis* est semé par ligne perpendiculaire au billon (environ 1 mètre) : 33g de graines/lignes, espacement de 50 cm entre les lignes.
- Pour le mélange *C. juncea* x *C. spectabilis*, les semis se font tous les 25 cm en alternant une ligne de *C. spectabilis* (33g de graines/ml) et une ligne de *C. juncea* (25g de graines/ml).
- Les tomates sont plantées sur 1 ligne par billon, espacement de 50cm.

Nom	Espacement Sur le rang (cm)	Nombre de graines ou nb plants/m linéaire (Largeur d'un billon)	poids de g/ml	Nombre de graines ou plant/UE
Cives	10	5		1500
Crotalaria juncea ( Brésil) + Crotalaria Spectabilis	4	25	1,395	1500
	3	33	0,57	2000
Crotalaria Spectabilis	3	33	0,57	2000
Témoin Tomates	50	-		60

(Cf. doc Excel joint avec les **besoins totaux en graines et en plants**)

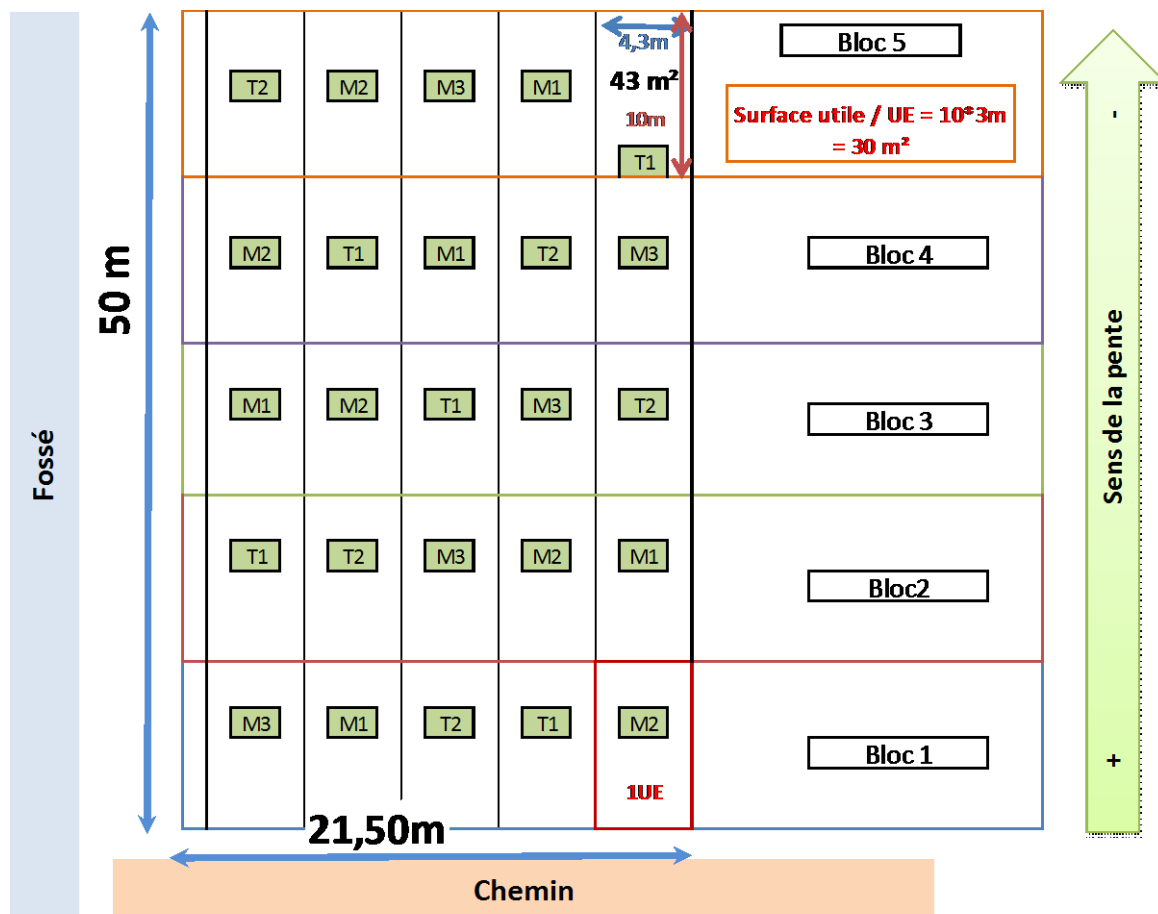
#### Engrais pour les plantes de service et les tomates lors de la mise en place de l'essai par UE

Besoins /UE en kg	Tomates	Légumineuse	Alliacées
Engrais	1,30	1,04	1,57
Urée	0,65	0,00	0,39
Phosphate		0,00	0,36

#### Mode opératoire :

Le dispositif expérimental est un dispositif en blocs randomisés, avec 5 blocs (soit 5 répétitions ; Cf. Figure 1)

Chaque bloc est composé de 5 traitements: 3 modalités « plantes de service » (M1, M2, M3) & 2 « Témoins » (T1, T2) disposés de manière aléatoire (cf. doc Excel pour plan des parcelles).



**Figure 1** : plan du dispositif expérimental (EPLEFPA, Macouria)

(Cf. : fiche pratique pour la mise en place de la phase 2)

### **PHASE 3 : Mise en place des aubergines**

**Durée** : minimum 2 mois

**But** : évaluer les effets des différentes plantes de service en interculture et du mulch sur l'expression du flétrissement bactérien, sur la croissance végétative et enfin sur le rendement en aubergines.

**Matériel** :

- 1500 plants d'aubergines variété Kalenda

**Mode opératoire** :

- Transplanter les jeunes plants d'aubergines âgés de 3 semaines sur l'ensemble des 15 billons.



- Remplacer au cours des 10 premiers jours les plants morts dû aux attaques de ravageurs tels que courtilières, etc.

## EXPÉRIMENTATION ET SUIVI

Un cycle de tomates est mise en place (Phase 1). Ensuite, un cycle végétatif de chaque plante de service est réalisé (Phase 2, du semis jusqu'à la floraison pour les légumineuses), puis les plantes entières sont coupées à la base de la tige. La biomasse fraîche aérienne est ensuite déposée à la surface du sol « sous forme de mulch », puis des plants d'aubergine sont transplantés en direct, sans travail du sol (Phase 3). Pour les cives, les parties aériennes coupées repousseront naturellement et donc seront associées aux aubergines au cours de cette Phase 3.

**Phase 1 = phase végétative des tomates (30 jours)**

**Phase 2 = phase végétative des plantes de service + témoin Tomate (60 jours)**

**Témoin Tomate (Phase 2)** : le suivi du développement des symptômes de flétrissement bactérien sera réalisé sur les tomates sur une période de 60 jours. Les plants flétris au cours de la phase culturale seront laissés sur pied puis l'ensemble des plants de tomate (flétris et non flétris) sera arraché en fin de Phase 2 (stade 70 jours). Des empreintes seront faites sur les plants sains restant afin de voir s'ils sont colonisés par la bactérie.

**Phase 3 = phase végétative du bioindicateur Aubergine (minimum de 60 jours et plus si possible)**

L'effet de chaque plante de service sur le flétrissement bactérien sera mesuré via le suivi du développement des symptômes de flétrissement bactérien sur le bioindicateur aubergine.

**ÉVALUATION DE L'INCIDENCE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN (Essai au champ) (relever les données pluvio +T°)**

- Suivi du développement de la maladie sur tomates en Phase 2 pendant 70 jours. Les plants sans symptômes seront testés pour les infections latentes à 70 jours.
- 1 seule date de transplantation du bioindicateur « Aubergine » : en Phase 3. Les plantules d'aubergine (60 plantes/unité expérimentales, UE, 5 REPs) âgées de 2 à 3 semaines (3-4 feuilles vraies) sont transplantées afin d'estimer le potentiel infectieux du sol soumis à la pré-culture des différentes espèces de PdS.

20 plants d'aubergine/UE feront l'objet de ces suivis, soit un total de 100 plants/traitement. Le nombre de plants d'aubergines flétries sera enregistré 2 fois par semaine pendant 60 jours ; > 5 semaines si possibilité de suivi du développement végétatif et du rendement. On limitera les effets de bordure en prenant les 20 plants au centre des 3 billons.

Dès le 4<sup>e</sup> jour après transplantation des aubergines, le suivi du développement du flétrissement bactérien sera enregistré selon l'échelle 0-1 :

- 0 = sans symptôme
- 1 = plant au  $\frac{3}{4}$  flétri ou mort de flétrissement bactérien,

Les suivis se feront 2 fois par semaine, les mardi et vendredi (enregistrement sur fiches et saisie des données sur tableur Excel)

L'indice de maladie, l'aire sous la courbe seront calculés pour chaque traitement plantes de service et comparés aux deux témoins.

Les données seront exprimées en proportion de flétrissement (%), puis transformées en ASINRac(IF) pour l'analyse statistique. Les valeurs des AUDPC seront transformées en Rac(AUDPC)

#### **MESURE DU RENDEMENT (Kg/Ha)**

Le rendement sera mesuré pour chaque UE. À chaque récolte, le poids d'aubergines récoltées sera enregistré. La récolte se fera une fois par semaine.

## Annexe 7 : Liste complète des prélèvements réalisés chez les agriculteurs

numéro labo	numéro échantillon	plante hôte	nom de l'exploitant	ville/lieu dit	date échantillon	date mise en tube	Précédent
012-007	E1A1	Aubergine	Jean René VICTOR	Montsinéry	27/03/2012	06/04/2012	Forêt
012-008	E1A2	Aubergine	Jean René VICTOR	Montsinéry	27/03/2012	06/04/2012	Forêt
012-011	E2A1	Aubergine	Nading marlon	Saint Laurent	12/04/2012	19/04/2012	Haricot long
012-012	E2A2	Aubergine	Nading marlon	Saint Laurent	12/04/2012	19/04/2012	Haricot long
012-013	E2A3	Aubergine	Nading marlon	Saint Laurent	12/04/2012	19/04/2012	Haricot long
012-014	E3PI1	Piment	Mato Roland	Saint Laurent	12/04/2012	19/04/2012	Piment
012-015	E4T3	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-016	E4T20	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-018	E4T11	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-021	E4T7	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-022	E4T10	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-023	E4T2	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-024	E4T8	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-027	E4T17	Tomate	Exploitation de Matiti	Matiti	13/04/2012	19/04/2012	Jachère
012-028	E6B4P8	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-029	E6B5P9	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-030	E6B9P6	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-031	E6B11P4	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-032	E6B7P6	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-033	E6B2P2	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-034	E6B3P2	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-035	E6B9P3	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-036	E6B8P6	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-037	E6B8P9	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-038	E6B3P3	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-039	E6B3P1	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-040	E6B3P5	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-041	E6B1P7	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-042	E6B4P3	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-043	E6B3P9	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-044	E6B13P9	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-045	E6B3P8	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-046	E6B5P5	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-047	E6B10P8	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-048	E6B12P4	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-049	E6B2P5	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-050	E6B2P3	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-051	E6B2P8	Tomate	Station expérimentale du CIRAD	Combi	17/04/2012	25/04/2012	Forêt

012-052	E5B2P7	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-053	E5B1P7	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-054	E5B13P8	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-055	E5B12P6	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-056	E5B2P2	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-057	E5B4P9	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-058	E5B3P4	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-059	E5B3P5	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-060	E5B3P1	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-061	E5B6P1	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-062	E5B5P9	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-063	E5B7P2	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-064	E5B2P4	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-065	E5B7P6	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-066	E5B11P6	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-067	E5B5P6	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-068	E5B1P5	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-069	E5B3P7	Tomate	Daoly Ly	Cacao	16/04/2012	25/04/2012	Forêt
012-070	E7B4P2	Tomate	Mme Wang	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-071	E7B5P7	Tomate	Mme Wang	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-072	E7B6P3	Tomate	Mme Wang	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-073	E8B8P8	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-074	E8B7P1	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-075	E8B13P5	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-076	E8B13P4	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-077	E8B10P2	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-078	E8B8P1	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-079	E8B5P9	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-080	E8B11P7	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-081	E8B10P3	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-082	E8B12P8	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-083	E8B12P1	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-084	E8B8P3	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-085	E8B9P7	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-086	E8B11P7	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt
012-087	E8B11P6	Tomate	TCHA Pierre	Corrossony 2	19/04/2012	27/04/2012	Forêt

**Annexe 8** : protocole de conservation des souches de *R. solanacearum* à température ambiante

Les colonies purifiées, caractéristiques de l'agent *R. solanacearum* (muqueuses, ovoïdes, blanches, au centre rosé rouge) sont alors prélevées pour repiquage avant mise en collection sur milieu CPG (cad: Etaler sur milieu CPG (non sélectif, et sans TTC), sur 3 secteurs :

**Préparation des microtubes de conservation**

Avec une micropipette, injecter 1 à 2 mL (suivant les tubes choisis) d'eau distillée stérile par tube, sous hotte à flux laminaire. Refermer les tubes.

**Stockage d'une souche**

A partir d'une culture de 1 à 2 jours sur CPG ou Kelman K+, prélever une colonie en raclant 1 anse 1µL par mL d'eau distillée stérile. Transférer le contenu de cette anse dans un tube d'eau distillée stérile. Refermer le tube, puis passer au vortex pour homogénéiser la suspension. Bien identifier le tube (N° de la souche, date de mise en conservation & enregistrement d'informations complémentaires dans cahier d'enregistrement des échantillons).

Ces souches en collection peuvent être repiquées tous les 6-8 mois selon l'aspect des solutions.

**Remise en culture**

Sous hotte, prélever une à deux anses 10µL dans le tube de conservation. Etaler cette anse sur milieu K+ ou CPG.

Source : Protocole fourni par P. Deberdt du PRAM-CIRAD (Martinique)

## **Annexe 9** : résultats des isolements en cours d'expérimentation en chambre climatique

Des isolements microbiologiques sont réalisés lors de l'expérimentation afin de valider la présence de *R. solanacearum* sur des plants ayant des symptômes du **FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN**. Sur les deux répétitions, un total de 16 plants de tomates et 8 plants de concombres sont isolés (tableau 5).

		Souche/Cultivar/n° plant	Résultat			Souche/Cultivar/n° plant	Résultat
Répétition 1	Tomate	E18T2/L390/9	+	Répétition 2	Tomate	E2PO3/L390/7	+
		E19T2/HW7996/1	+			E19T2/L390/3	+
		E18T2/L390/4	-			E19T2/L390/9	+
		E7A1/HW7996/11	+			E2CO2/L390/5	+
		E19T2/L390/1	+			E19T2/HW7996/1	+
		E2CO2/HW7996/3	+			E2CO2/HW7996/1	+
		E2PO3/L390/7	+			E16A2/L390/6	+
		Teau/HW7996/7	-			E14A6/L390/6	+
	Concombre	E7A1/EUREKA/10	-		Concombre	E2PO3/EUREKA/12	+
		E2PO3/EUREKA/8	-			E19T2/EUREKA/1	+
		E2CO2/EUREKA/3	+			E2CO2/EUREKA/9	+
		E2PO3/EUREKA/12	+				
		E19T2/EUREKA/1	+				

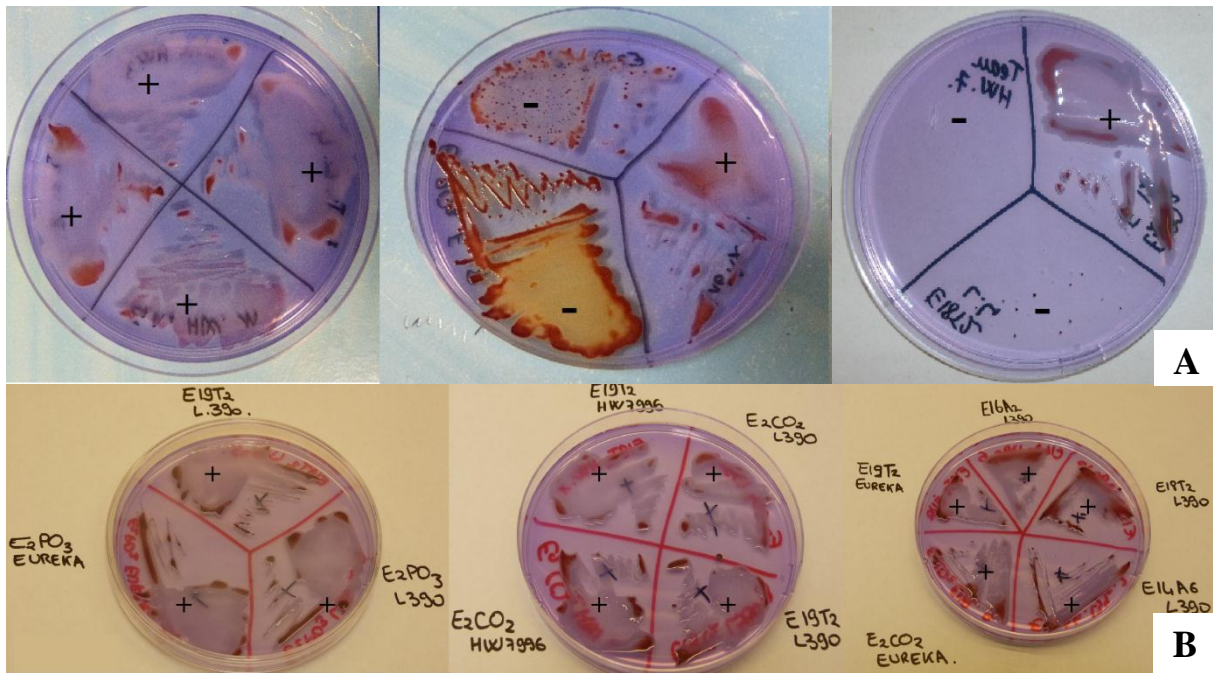
**Tableau** : résultats des isolements microbiologiques réalisés au cours de l'expérimentation sur concombres et tomates avec : (+) présence de *R. solanacearum* et (-) pas de *R. solanacearum*.

Lors de la répétition 1, les cultivars de tomates présentant des symptômes de flétrissement bactérien s'avèrent être dans la majorité des cas porteurs de l'agent pathogène *R. solanacearum*. Sur l'isolat E18T2/L390 aucune colonie de *R. solanacearum* ne s'est développée ; cependant, le plant présente des symptômes similaires aux autres plants flétris ce qui peut s'expliquer par le fait que le plant était sec et creux lors de l'isolement. Le Témoin eau/HW7996 est négatif ce qui atteste d'une absence d'une contamination entre les traitements.

Les 2 premiers plants de concombre prélevés (souches E7A1 et E2PO3) le 1<sup>er</sup> juin ne sont pas atteints de flétrissement bactérien alors que tous les plants prélevés, par la suite, sont porteurs de l'agent pathogène (souches E2CO2, E2PO3 et E19T2). Une attaque de pucerons sur une partie des plants peut expliquer leur mort.

Les premiers plants prélevés dans la répétition 2 sont tous atteints de flétrissement bactérien.





**Photographie :** Résultats des inoculations des premiers plants avec symptômes sur milieu SMSA (A) pour la répétition 1 et (B) pour la répétition 2. Le signe «+» signifie que la bactérie qui s'est développée est du *R. solanacearum* et le signe «-» signifie que la bactérie qui s'est développée n'est pas du *R. solanacearum*.

Les colonies virulentes de *R. solanacearum* forment des colonies fluides, lisses, à bords irréguliers, plates, blanchâtres. Toutes les souches de la photographie 5B sont des souches de *R. solanacearum*. On voit la différence avec les souches – de la photographie 5A qui sont plus granuleuses, d'un ton rouge-vif et d'un aspect sec.



**Annexe 10** : Tableau complet des coûts de mise en place de l'interculture

Dépenses		Quantité				P.U. (€)	Coût/UE				Coût/modalité						
		C. spectabilis	C. spectabilis + C. juncea	Cives	Témoins sensible		Témoins sol nu	C. spectabilis	C. juncea	Cives	Témoins sensible	Témoins sol nu	C. spectabilis	C. juncea	Cives	Témoins sensible	Témoins sol nu
Matériel Végétal	Aubergines (plants)	75,00	73,00	69,00	77,00	73,00	0,50	37,50	36,50	34,50	38,50	36,50	187,50	182,50	172,50	192,50	182,50
	C. juncea (kg de graine)			0,09			15,00	0,00	1,32	0,00	0,00	0,00	0,00	6,60	0,00	0,00	0,00
	C. spectabilis (kg de graine)	0,03		0,03			15,00	0,51	0,51	0,00	0,00	0,00	2,55	2,55	0,00	0,00	0,00
	Cives (kg)			30,00			7,00	0,00	0,00	210,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1050,00	0,00	0,00
	Tomates (plants)				60,00		0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	30,00	0,00	0,00	0,00	150,00	0,00
Consommable	Gazole (L)	2,00	2,00	1,30	1,30	1,30	1,00	2,00	2,00	1,30	1,30	1,30	10,00	10,00	6,50	6,50	6,50
Apports	0-20-23 (kg)	4,75	4,75	5,35	5,05	3,75	0,90	4,28	4,28	4,82	4,55	3,38	21,38	21,38	24,08	22,73	16,88
	31-0-0 (kg)	2,30	2,30	2,70	2,95	2,30	0,35	0,81	0,81	0,95	1,03	0,81	4,03	4,03	4,73	5,16	4,03
	Azofertil (kg)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,74	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
	Calcaire Broyé (kg)	1,00	1,00	0,60	1,00	1,00	0,10	0,10	0,10	0,06	0,10	0,10	0,50	0,50	0,30	0,50	0,50
	P. Naturel (kg)			0,35			0,36	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00
Traitement	Fusilade Max (L)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	30,00	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
	Karaté (L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,62	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Main d'œuvre	Salaires (h)+ charges sociales	2,86	3,69	8,70	3,24	2,76	14,10	40,33	52,03	122,67	45,68	38,92	201,63	260,15	613,35	228,42	194,58
TOTAL							85,80	97,82	374,70	121,45	81,28	429,01	489,12	1873,51	607,23	406,41	406,41

**Annexe 11 :** milieu de culture pour *R. solanacearum*

**- Milieu semi-sélectif :**

**Milieu SMSA modifié**

**Mélanger les réactifs suivant :**

Casamino acids : 1 g  
Peptone : 10 g  
Glycérol : 5 mL  
Agar 17 : g  
Eau distillée q.s.p. : 985mL

**Ajuster le pH à 7.2**

**Après autoclavage (120°C / 20 min), refroidir le milieu à 50°C puis ajouter :**

TTC : 50 mg	1 mL de solution-mère
Crystal violet : 5 mg	0,5 ml de solution 1%
Polymyxine B sulfate : 100 mg	10 mL de solution 1%
Bacitracine : 25 mg	2,5 mL de solution 1%
Chloramphénicol : 5 mg	0,5 mL de solution 1%
Pénicilline G : 0.5 mg	0,5 mL de solution 0,1%

Solutions-mères d'antibiotiques à 1% : 100 mg / 10 mL Ethanol 70°, sauf pour Polymyxine B sulfate : 300 mg/ 30 mL

Solution Pénicilline G 0.1% : 30 mg dans 30 mL d'eau bidistillée, puis stérilisation par filtration 0.2 µm

*Source : Elphinstone et al 1996, cité par Schaad, Jones & Chun (2001)*

**- Milieux non sélectifs :**

**Milieu Kelman modifié (K+)**

**Mélanger les réactifs suivant :**

Bacto Peptone : 10 g  
Glucose: 5 g  
Casamino acids : 1 g  
Yeast Extract : 1 g  
Agar : 15 g  
Eau distillée qsp : 1000 ml

**Ajuster le pH à 7.2**

**Après autoclavage (120°C / 20 min), refroidir le milieu à 50°C puis ajouter :**

Clhoreure de Tétrazolium TTC (50 mg/ml) 1 ml

Milieu CPG :

**Mélanger les réactifs suivant :**

Bacto Peptone : 10 g  
Glucose : 5 g  
Casamino acids : 1 g  
Yeast Extract : 1 g  
Agar : 15 g  
Eau distillée qsp : 1000 ml

**Ajuster le pH à 7,2**

**Autoclaver 120°C pendant 20 minutes.**

**- Tampon d'extraction :**

Tampon Tris à 0,01 M et pH = 7,2

**Mélanger les réactifs suivant :**

Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane : 1,211 g  
Eau distillée : 1000 mL

**Ajuster à pH 7,2 (HCl dilué)**

**Autoclaver 120°C pendant 20 min**

Source : Protocole fourni par P. Deberdt du PRAM-CIRAD (Martinique)